

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第4116082号
(P4116082)

(45) 発行日 平成20年7月9日(2008.7.9)

(24) 登録日 平成20年4月25日(2008.4.25)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00

請求項の数 32 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-511706	(73) 特許権者 マトリテック、インコーポレイテッド アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 6 O, ニュートン, ネバダ ストリート 3 3 O
(86) (22) 出願日 平成9年8月19日(1997.8.19)	
(65) 公表番号 特表2001-500609 (P2001-500609A)	
(43) 公表日 平成13年1月16日(2001.1.16)	
(86) 国際出願番号 PCT/US1997/014526	
(87) 国際公開番号 W01998/009170	(74) 代理人 弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日 平成10年3月5日(1998.3.5)	
審査請求日 平成16年8月6日(2004.8.6)	(72) 発明者 ケーシー, スーザン ケイ. アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 1 4 5 1, ハーバード, オーク ヒル ロー ド 8 7
(31) 優先権主張番号 08/705,660	(72) 発明者 オバール, ロバート アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 O 8 1, ウェルポール, ルイス アベニュー ー 1 9
(32) 優先日 平成8年8月30日(1996.8.30)	
(33) 優先権主張国 米国 (US)	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 子宮頸ガンの検出のための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトにおいて子宮頸ガンを検出する方法であって、以下：
該ヒトから単離されたサンプルにおいて、配列番号 1；配列番号 2；配列番号 3；配列番号 4；配列番号 5；配列番号 6；配列番号 7；配列番号 8；配列番号 9；および配列番号 10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むタンパク質の存在または非存在を検出する工程、
を包含し、該タンパク質の存在または非存在が、該ヒトにおける子宮頸ガンの存在または非存在の指標である、方法。

【請求項 2】

前記タンパク質が配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記タンパク質が配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記タンパク質が配列番号 3 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記タンパク質が配列番号 4 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記タンパク質が配列番号 5 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記タンパク質が配列番号 6 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記タンパク質が配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記タンパク質が配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記タンパク質が配列番号 9 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記タンパク質が配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

10

前記サンプルが、組織サンプルまたは体液サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記サンプルが、生検サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記サンプルが、子宮頸部細胞サンプルである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

前記サンプルが、パパニコラウスミアである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

ヒトにおいて子宮頸ガンを検出する方法であって、以下の工程：

(a) 該ヒト由来のサンプルを、子宮頸ガン関連タンパク質に特異的に結合する結合部分と接触させて結合部分 - 子宮頸ガン関連タンパク質複合体を生成する工程であって、該結合部分が配列番号 10 に示されるアミノ酸配列を含むタンパク質に特異的に結合し得るとして特徴づけられる、工程；および

20

(b) 該複合体の存在または非存在を検出する工程であって、該複合体の存在または非存在が該ヒトにおける子宮頸ガンの存在または非存在の指標である、工程、を包含する、方法。

【請求項 17】

前記子宮頸ガン関連タンパク質が、二次元ゲル電気泳動により決定された場合、正常ヒト子宮頸部細胞におけるよりも、ヒト子宮頸ガン細胞においてより高いレベルで検出可能であるとしてさらに特徴づけられる、請求項 16 に記載の方法。

30

【請求項 18】

前記サンプルが、組織サンプルまたは体液サンプルである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記サンプルが、生検サンプルである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 20】

前記サンプルが、パパニコラウスミアである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 21】

前記サンプルが、子宮頸部細胞サンプルである、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 22】

前記結合部分が、抗体、抗体フラグメント、および生合成抗体結合部位からなる群より選択される、請求項 16 に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記結合部分が抗体である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 24】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗体が検出可能な部分で標識されている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

前記モノクローナル抗体が、検出可能な部分で標識されている、請求項 24 に記載の方法。

50

【請求項 27】

ヒトにおいて子宮頸ガンを検出する方法であって：

該ヒトの組織サンプルまたは体液サンプルにおける核酸分子の存在または非存在を検出し、それにより該ヒトにおける子宮頸ガンの存在または非存在を示す工程であって、該核酸分子が以下：

(a) 配列番号 1；配列番号 2；配列番号 3；配列番号 4；配列番号 5；配列番号 6；配列番号 7；配列番号 8；配列番号 9；および配列番号 10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む子宮頸ガン関連タンパク質に特異的に結合し得る配列を含む核酸分子；ならびに

(b) 配列番号 1；配列番号 2；配列番号 3；配列番号 4；配列番号 5；配列番号 6；配列番号 7；配列番号 8；配列番号 9；および配列番号 10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む子宮頸ガン関連タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子、

からなる群より選択される、工程、
を包含する、方法。

【請求項 28】

前記サンプルを、前記核酸分子の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズし得る標識されたハイブリダイゼーションプローブと反応させるさらなる工程を包含する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記核酸分子が、転移した子宮頸ガンに関連するタンパク質に特異的に結合し得、そして該核酸分子の存在が、転移した子宮頸ガンの存在指標である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

子宮頸ガンの存在を検出するための、または子宮頸ガンの治療的処置の効力を評価するためのキットであって、以下：

(a) ヒトの組織サンプルまたは体液サンプルを受ける容器；と

(b) 配列番号 1；配列番号 2；配列番号 3；配列番号 4；配列番号 5；配列番号 6；配列番号 7；配列番号 8；配列番号 9；および配列番号 10 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む子宮頸ガン関連タンパク質に特異的に結合し得る結合部分、との組合せ、を含む、キット。

【請求項 31】

正常子宮頸部細胞の指標である参照サンプルをさらに含む、請求項 30 に記載のキット。

【請求項 32】

前記結合部分が、抗体、抗体フラグメント、および生合成抗体結合部位からなる群より選択される、請求項 30 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、一般に、子宮頸ガンの検出のための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、(i) 子宮頸ガンの検出において、および(ii) 子宮頸ガン治療のための分子標的として有用な細胞性マーカーとして作用する子宮頸ガン関連タンパク質に関する。

発明の背景

子宮頸部のガンは、女性において最も普遍的な悪性腫瘍の 1 つで、そして世界中で重大な公衆衛生問題として残ったままである。合衆国単独において、侵襲性子宮頸ガンは、すべての婦人科のガンのおよそ 19% を数える (Miller ら、(1993)、「Surveillance Epidemiology, and End Results Program cancer Statistics Review: 1973-1990」、NIH 刊行番号第 93 - 2789、Bethesda, MD: National Cancer Institute)。1996 年には、この疾患に起因して 14,700 の新たに診断された症例および 4,900 の死者が出ると推定されている (American Cancer Society, Cancer Facts & Figures 1996, Atlanta, GA: American Cancer Society, 1996)。集団検診プログラムが広範に利用可能ではない多くの発展途上国において、臨床問題はより深刻である。全世界で、新たな症例数は、471,000 であると推定され

10

20

30

40

50

、その4年生存率は40%である(Munozら(1989)「Epidemiology of Cervical Cancer」、Human Papillomavirus, New York, Oxford Press,9-39頁;およびNational Institutes of Health, Consensus Development Conference Statement on Cervical Cancer, 1996年4月1~3日)。

子宮頸ガンの前駆体は、形成異常であり、子宮頸部上皮内新生物(CIN)または扁平上皮内傷害(SIL)としても当該分野で公知である(Brintonら(1992)「Epidemiology of Cervical Cancer: Overview」、「The Epidemiology of Cervical Cancer and Human Papillomavirus」中、Lyon, France: International Agency for Research on Cancer;およびTabbaraら、(1992)「The Bethesda classification for squamous intraepithelial lesions: histologic, cytologic and viral correlates」、Obstet. Gynecol. 79:338-346)。正常細胞がいかに形質転換されるかは理解されていないが、正常層状上皮からCINを介して侵襲性ガンへの組織病理学的変化の連続スペクトルの概念は、何年もの間広範に受容されてきた(例えば、Mitchellら(1994)「The natural history of cervical intraepithelial neoplasia: an argument of intermediate endpoint biomarkers」、Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 3:619-626を参照のこと)。ヒトパピローマウイルス(HPV)感染を子宮頸ガンにおける原因因子として確立する疫学および分子生物学的証左がかなり集められている(Munozら(1992)「The Epidemiology of Human Papillomavirus and Cervical Cancer」、IRAC刊行物第119号、Lyon France: Int. Agency for Research on Cancer, 251~261頁)。HPVは、扁平上皮細胞侵襲病変の85%以上に見い出され、これは、子宮頸ガンにおいて見い出される最も通常の組織学型を表す(Coxら、(1995) Baillieres' Clin. Obstet Gynaecol. 91-37)。さらなる補因子は、例えば、点変異によって活性化されるオンコジーン、および欠失の染色体転位を含む(Spandidosら(1989) J. Pathol. 157:1-10)。

パパニコラウ染色子宮頸部スミア(パパニコラウスミアとしても言及される)の細胞学的検査は、現在、子宮頸ガンを検出するための選り抜きの方法である。この試験の歴史的成功にも関わらず、同一の前侵襲性病変の挙動を信頼性高く予測することの能力についての懸念が生じてきている(Ostorら(1993) Int. J. Gynecol. Pathol. 12:186-192;およびGenestら、(1993) Human Pathol. 24:730-736)。信頼性高く子宮頸ガンの発症初期の検出および/または早期予後情報を提供するための子宮頸ガン関連腫瘍マーカーの同定は、子宮頸ガンの管理を大いに補助する。

すべての真核生物細胞は、DNAを含む核すなわちクロマチンを有する。これは、核マトリックス(NM)として知られる内部タンパク質足場により組織化される。核マトリックスは、1974年に初めてBerezneyらによって記載された(Berezneyら、(1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60:1410-1417)。Penmanらは、不溶性の内部核マトリックスタンパク質およびそれらの関連する核酸を細胞から選択的に抽出し、そして2次元ゲル電気泳動によってタンパク質を分析することにより特定の細胞型を決定する方法を記載する(例えば、米国特許番号第4,882,268号(89年11月21日公布)、同4,885,236号(89年12月5日公布)を参照のこと、これらの開示は本明細書中で参考として援用される)。

核マトリックスは、遺伝子発現の制御に基本的な広範な種々の核機能に関与していると考えられている。一般的な総説については、例えば、Feyら、(1991) Crit. Rev. Euk. Gene Express. 1:127-143を参照のこと。組織特異的な核マトリックスタンパク質は、ラット、マウス、およびヒトにおいて同定されている。Feyら(1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:121-125; Stuurmanら(1990) J. Biol. Chem. 265:5460-5465; およびGetzenbergら(1990) Mol. Endocrinol. 4:1336-1342。特定の核マトリックスタンパク質の存在または非存在における変化は、細胞のトランスフォーメーションおよび分化に関連している(Bidwellら、(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3162-3166; Brancoliniら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:6936-6940; およびGreenfieldら(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:11217-11221)。

同様の方法論を使用するいくつかの最近の研究によって、腫瘍特異的核マトリックスタンパク質が前立腺(Partinら(1993) Cancer Res. 53:744-746)、乳房(Khanujaら(1993

10

20

30

40

50

) Cancer Res. 53:3394-3398)、結腸ガン (Keesecら (1994) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:1913-1916)、骨 (Bidwellら (1994) Cancer Res. 54:28-32)、膀胱 (Getzenbergら、(1996) Cancer Res. 56:690-694)、および咽頭 (Donatら (1996)、Otolaryngol. Head Neck Surg.114:387-393)のガンにおいて同定されている。しかし、特定の核マトリックスタンパク質の分子的特徴付けは、細胞中のこれらのタンパク質の低頻度および一般的に不溶性の特性に起因してまだ充分定義されていないままである。

しかし、正常およびガンの子宮頸部組織において異なって発現し、そして子宮頸ガンの検出またはその発症の予知において有用であり得る特異的な信頼性のあるマーカーに対する当該分野での必要性が存在する。従って、本発明の目的は、個体における子宮頸ガンの早期および/または迅速な検出のためのマーカーとして有用な子宮頸ガン関連分子を提供することである。本発明の別の目的は、個体における子宮頸ガンを検出するための方法を提供することである。本発明の別の目的は、個体における子宮頸ガンを処置しそして個体における処置の効力をモニタリングするための方法および組成物を提供することである。

発明の要旨

本発明は、個体の組織サンプルまたは体液サンプル中の子宮頸ガンの検出および/または予測のための種々の方法および組成物を提供する。本発明は、部分的に、二次元ゲル電気泳動によって決定された場合、子宮頸ガン細胞中に検出可能なレベルで存在するが、正常細胞においては検出可能ではない子宮頸ガン関連タンパク質の発見に基づく。

1つの局面において、本発明は、ヒトにおける子宮頸ガンの検出のための方法を提供する。本方法は、ヒトの組織サンプルまたは体液サンプル中の子宮頸ガン関連タンパク質の存在を検出し、それにより子宮頸ガンまたは子宮ガンの前駆体の存在を示す工程を包含する。子宮頸ガン関連タンパク質は、標準的なポリアクリルアミドゲル電気泳動技術により決定された場合、約44,900ダルトン～約69,400ダルトンの分子量、および標準的な等電点電気泳動技術により決定された場合、約5.1～約6.6の等電点を有するとして特徴づけられる。さらに、子宮頸ガン関連タンパク質は、二次元ゲル電気泳動により決定された場合、正常ヒト子宮頸部細胞におけるよりも、ヒト子宮頸ガン細胞においてより高いレベルで検出される非クロマチンタンパク質であるとして、さらに特徴づけられる。しかし、方法の正確さおよび信頼性は、予め選択された組織サンプルまたは体液サンプルにおける複数の子宮頸ガン関連タンパク質の存在を検出することによりさらに増強され得ることが意図される。

本明細書中において用いられる用語「子宮頸ガン」は、子宮頸部組織または子宮頸部細胞に関連する任意のガンまたはガン性病変を意味することが理解され、そしてさらに、子宮頸ガン(例えば、形成異常(当該分野で子宮頸部上皮内新生物または扁平上皮細胞内病変としても知られる))の前駆体を含む。

本明細書中において用いられる用語「子宮頸ガン関連」分子は、子宮頸ガン細胞(単数または複数)に由来しそして子宮頸ガン細胞から単離可能であり、そして実質的に正常子宮頸部細胞(単数または複数)には由来もせずかつ単離可能でもない分子をいう。本明細書中において用いられる用語「子宮頸ガン関連タンパク質」は、二次元(2-D)ゲル電気泳動により決定された場合、正常子宮頸部細胞におけるより子宮頸ガン細胞においてより高いレベルで検出可能である任意のタンパク質を意味すると理解される。標的分子または標的タンパク質が子宮頸ガン細胞に独特である必要はない。むしろ、標的分子または標的タンパク質は子宮頸ガン組織または体液に由来するサンプルと正常子宮頸部組織または体液に由来するサンプルとの間を差別化するのに十分なシグナル対ノイズ比(ration)を有することが好ましい。

好ましい実施態様において、本発明の方法は、本明細書中でCvC-1～CvC-5として言及される1つ以上の子宮頸ガン(CvC)関連タンパク質を検出する工程を包含する。これらのタンパク質は、当該分野で周知でかつ徹底的に記載されている核マトリックスタンパク質精製方法論を用いて精製または同時精製され得る。例えば、Feyら(1986)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:121-125(この開示は本明細書中で参考として援用される。)を参照のこと。本明細書中において用いられるように、用語「核マトリックスタンパク質」は、任意の非

細胞骨格、非ラミン、非クロマチンタンパク質であって、(i)哺乳動物細胞核から単離され、(ii)0.25M硫酸アンモニウムにおける核からの可溶化に耐性であり、(iii)8M尿素からの生理学的緩衝液への透析後に溶液中に残存し、かつ(iv)銀染色2次元電気泳動ゲル上で検出可能であることを意味すると理解される。従って、1つ以上の得られた子宮頸ガン関連タンパク質は、核マトリックスタンパク質であるとさらに定義され得る。

好ましい実施態様において、本発明の方法は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定された場合、約69,400ダルトンの分子量、および等電点電気泳動技術により決定された場合、約5.8のpIを有するタンパク質である、タンパク質CvC-1を検出する工程を含み得る。あるいは、本発明の方法は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定された場合、約53,800ダルトンの分子量、および等電点電気泳動技術により決定された場合、約5.5のpIを有するタンパク質である、タンパク質CvC-2を検出する工程を含み得る。あるいは、本発明の方法は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定された場合、約47,900ダルトンの分子量、および等電点電気泳動技術により決定された場合、約5.6のpIを有するタンパク質である、タンパク質CvC-3を検出する工程を含み得る。あるいは、本発明の方法は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定された場合、約46,000ダルトンの分子量、および等電点電気泳動技術により決定された場合、約5.1のpIを有するタンパク質である、タンパク質CvC-4を検出する工程を含み得る。あるいは、本発明の方法は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により決定された場合、約44,900ダルトンの分子量、および等電点電気泳動技術により決定された場合、約6.6のpIを有するタンパク質である、タンパク質CvC-5を検出する工程を含み得る。

別の好ましい実施態様において、本発明の方法は、子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。このタンパク質は、以下から成る群より選択される連続アミノ酸配列を含む：配列番号1；配列番号2；配列番号3；配列番号4；配列番号5；配列番号6；配列番号7；配列番号8；および配列番号9。あるいは、本発明の方法は、配列番号10（通常当該分野でIEF SSP 9502として言及される）に示されるアミノ酸配列を有する子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。例えば、Honoreら（1994）Gene 151:291-296（この開示は本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

別の好ましい実施態様において、本発明の方法は、子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。このタンパク質は、以下から成る群より選択される連続アミノ酸配列を含む：配列番号11；配列番号12；配列番号13；配列番号14；配列番号15；配列番号16；および配列番号17。あるいは、本発明の方法は、配列番号18に示されるアミノ酸配列を有し、そして通常当該分野でもサイトケラチン17として言及される子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。例えば、Trojanovskyら（1992）J.Biol.Biol. 59:127-137（この開示は本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

別の好ましい実施態様において、本発明の方法は、子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。このタンパク質は、以下から成る群より選択される連続アミノ酸配列を含む：配列番号19；配列番号20；配列番号21；配列番号22；配列番号23；配列番号24；および配列番号25。あるいは、本発明の方法は、配列番号26に示されるアミノ酸配列を有し、そして通常当該分野でTDP-43として言及される子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。例えば、Ouら（1995）J.Virol. 69:3584-3596（この開示は本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

別の好ましい実施態様において、本発明の方法は、子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。このタンパク質は、以下から成る群より選択される連続アミノ酸配列を含む：配列番号27；配列番号28；配列番号29；配列番号30；配列番号31；配列番号32；および配列番号33。あるいは、本発明の方法は、配列番号34に示されるアミノ酸配列を有し、そして通常当該分野でNup358として言及される子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。例えば、Wuら（1995）J.Biol.Chem. 270:14209-14213（この開示は本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

別の好ましい実施態様において、本発明の方法は、子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。このタンパク質は、以下から成る群より選択される連続アミノ酸配列を

10

20

30

40

50

含む：配列番号 35；配列番号 36；配列番号 37；配列番号 38；配列番号 39；配列番号 40；配列番号 41；配列番号 42；配列番号 43；配列番号 44；および配列番号 45。あるいは、本発明の方法は、配列番号 46 に示されるアミノ酸配列を有し、そして通常当該分野でラミンAとして言及される子宮頸ガン関連タンパク質を検出する工程を含み得る。例えば、Fisherら（1986）Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 83:6450-6454（この開示は本明細書中で参考として援用される）を参照のこと。

本発明の方法は、任意の関連する組織サンプルまたは体液サンプルにおいて実施され得る。例えば、本発明の方法は、子宮頸部組織、より好ましくは子宮頸部生検組織、そしてより好ましくはパパニコラウスミアにおいて実施され得る。あるいは、本発明の方法は、以下から群より選択されるヒト体液サンプルにおいて実施され得る：血液；血清；血漿；糞便；尿；腔分泌液；髄液；唾液；腹水液；腹膜液；痰；および胸部浸出液。しかし、本発明の方法はまた、他の組織サンプルまたは体液サンプルにおける転移した子宮頸ガン細胞についてのアッセイにおいて有用であり得ることが意図される。

組織サンプルまたは体液サンプルにおける子宮頸ガンに関連するマーカータンパク質は、当該分野で利用可能な多数のアッセイ方法のいずれかを用いて検出され得る。1つの実施態様において、例えば、マーカー子宮頸ガン関連タンパク質は、マーカータンパク質に特異的に結合し得、それにより結合部分とマーカータンパク質との標識複合体を生成し得る標識結合部分と反応し得る。その後、この標識複合体は、当該分野で周知の従来の方法論を用いて検出され得る。標識複合体の存在の検出は、試験される個体における子宮頸ガン細胞または子宮頸部前ガン細胞の存在の指標を提供し得る。本明細書中で用いられる用語「結合部分」は、約 10^5M^{-1} より大きい結合親和性で子宮頸ガン関連タンパク質に特異的に結合し得る任意の結合パートナーを意味すると理解される。本明細書中で用いられる用語「特異的に結合している」、「特異的に結合した」、および「特異的に結合する」は、約 10^5M^{-1} より大きい結合親和性での結合相互作用をいう。本明細書中で用いられる場合、結合部分は、検出可能な部分（例えば、放射性標識、蛍光標識、分光学的標識、または酵素標識）により当該分野で周知の技術を用いて標識される。

標的タンパク質と相互作用し、そして特異的に結合する結合部分が、当該分野で周知の従来の方法を用いて設計され得ることが理解される。本発明において、結合部分は、抗体（例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体）であり得る。モノクローナル抗体が好ましい。しかし、本発明の実施に有用な他の有用な結合部分は、例えば、生合成抗体結合部位（当該分野で、BABSまたはsFv'ともいわれる）、および抗体フラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、(Fab')₂フラグメント）を含み得ることが意図される。BABSおよび抗体フラグメントの調製、試験、および標識のための手順は、当該分野で周知であり、それゆえ本明細書中で詳細に議論はしない。

別の実施態様において、サンプル中の1つ以上のマーカータンパク質が、まずサンプルからタンパク質を単離し、次いでタンパク質を二次元ゲル電気泳動によって分離し、特徴的な二次元ゲル電気泳動パターンを生成することによって検出され得る。次いで、ゲル電気泳動パターンは、標準（例えば、ゲル電気泳動パターンのデータベースから得られる標準的ゲルパターン）と比較され得る。従って、別の実施態様において、本発明は、子宮頸ガン関連タンパク質の電気泳動ゲルパターンまたは電気泳動図（これらは、子宮頸ガンを個体中に検出するのに有用である）を提供する。

本発明の子宮頸ガン関連タンパク質は、核マトリックスタンパク質単離手順（例えば、米国特許第4,885,236号および米国特許第4,882,268号（その開示は本明細書中で援用される））に開示される手順）を用いて、子宮頸ガン細胞から精製または同時精製され得る。あるいは、マーカータンパク質は、一旦同定されそして特徴づけられると、当業者に周知の一連のタンパク質精製プロトコル（例えば、アフィニティークロマトグラフィー）のいずれかによってサンプルから単離されて、単離されたタンパク質を生じ得る。本明細書中で使用される用語「単離された」は、望ましくない、夾雑タンパク質様（proteinaceous）物質を実質的に含まないことを意味すると理解される。

さらに、当業者は、単離されたマーカータンパク質全体またはそのフラグメントをコード

10

20

30

40

50

する核酸配列を、現在当該分野で利用可能な方法（例えば、Maniatisら、編（1989）「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」Cold Spring Harbor Press）を用いて生成し得る。例えば、単離された子宮頸ガン関連タンパク質は、従来のペプチド配列決定プロトコル、次いでcDNAライブラリーをスクリーニングするために設計されたオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションプローブを用いて配列決定され得る。次いで、cDNAライブラリーは、得られるオリゴヌクレオチドでスクリーニングされ、単離されたタンパク質をコードする全長または部分長cDNA配列が単離され得る。

さらに、当業者は、米国特許第4,885,236号および同第4,882,268号に記載される方法論を用いて、子宮頸ガン関連タンパク質を認識し得、そしてそれにより特異的に結合され得る配列を有する核酸分子を細胞サンプルから単離し得る。このような手順において、可溶性タンパク質は、生理学的pHおよびイオン強度にて、哺乳動物細胞を非イオン性界面活性剤溶液で抽出することによって核および細胞骨格から分離される。次いで、不溶性タンパク質および核酸は、DNAaseで消化され、次いで緩衝化硫酸アンモニウム溶液で溶出され、子宮頸ガン関連タンパク質を認識し得、そしてそれにより特異的に結合され得る核酸分子を生成する。次いで、任意の残存するタンパク質が標的核酸分子から分離される。

従って、前述の核酸分子の検出は、個体における子宮頸ガンおよび/または転移子宮頸ガンの存在の指標として役立ち得る。従って、別の局面において、本発明は、ヒトにおいて子宮頸ガンを検出するための別の方法を提供する。この方法は、組織または体液サンプル中の核酸分子の存在を検出し、それにより個体における子宮頸ガンの存在を示す工程を包含する。核酸分子は、(i) 子宮頸ガン関連タンパク質を認識し得、そしてそれにより特異的に結合され得る配列を含む核酸分子、および(ii) 子宮頸ガン関連タンパク質をコードする配列を含む核酸分子からなる群より選択される。本明細書中で定義される子宮頸ガン関連タンパク質は、(i) 分子量約69,400ダルトンおよび等電点約5.8を有するタンパク質；(ii) 分子量約53,800ダルトンおよび等電点約5.5を有するタンパク質；(iii) 分子量約47,900ダルトンおよび等電点約5.6を有するタンパク質；(iv) 分子量約46,000ダルトンおよび等電点約5.1を有するタンパク質；ならびに(v) 分子量約44,900ダルトンおよび等電点約6.6を有するタンパク質、からなる群より選択されるものとして特徴づけられ、ここで各例において分子量は、標準的なポリアクリルアミドゲル電気泳動技術によって決定され、そして等電点は、標準的な等電点電気泳動技術によって決定され、そしてここで子宮頸ガン関連タンパク質は、二次元ゲル電気泳動によって決定される場合に、正常ヒト子宮頸部の細胞においてよりもヒト子宮頸ガン細胞において高いレベルで検出可能である非クロマチンタンパク質であるとしてさらに特徴づけられる。

サンプル中の標的核酸分子は、例えば、ノーザンブロット分析によって、サンプルを、マーカータンパク質をコードする核酸分子の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズし得る標識されたハイブリダイゼーションプローブ（例えば、³²P標識オリゴヌクレオチドプローブ）と反応させることによって検出され得る。従って、子宮頸ガン関連タンパク質をコードするか、または子宮頸ガン関連タンパク質により特異的に結合され得るかのいずれかである核酸分子の検出は、試験される個体における子宮頸ガンの存在の指標として役立ち得る。

別の局面において、本発明は、子宮頸ガンの存在を検出するための、または子宮頸ガンの治療的処置の効力を評価するためのキットを提供する。このようなキットは、(i) 個体からのヒト組織または体液サンプルを受けるための容器、(ii) マーカー子宮頸ガン関連タンパク質上のエピトープ、またはマーカー子宮頸ガン関連タンパク質の少なくとも一部をコードする核酸配列のいずれかに特異的に結合する結合パートナー、(iii) 結合パートナーの、子宮頸ガン関連タンパク質、または子宮頸ガン関連タンパク質の少なくとも一部をコードする核酸配列のいずれかとの結合を検出するための手段、および(iv) 参照サンプルを組み合わせて含み得る。

キットの1つの実施態様において、結合部分は、分子量約69,400ダルトンおよび等電点約5.8；分子量約53,800ダルトンおよび等電点約5.5；分子量約47,900ダルトンおよび等電点約5.6；分子量約46,000ダルトンおよび等電点約5.1、または分子量約44,900および等電点

10

20

30

40

50

約6.6を有するものとしてさらに定義されるタンパク質の群から選択される子宮頸ガン関連タンパク質に特異的に結合する。ここで、分子量が、従来のポリアクリルアミドゲル電気泳動方法論によって決定され、そして等電点は、従来の等電点電気泳動方法論によって決定される。

キットの別の実施態様において、参照サンプルは、ネガティブおよび/またはポジティブコントロールを含み得る。ネガティブコントロールは、正常子宮頸部細胞型の指標であり、そしてポジティブコントロールは、子宮頸ガンの指標である。

別の局面において、本発明は、子宮頸ガンを処置するための方法を提供する。この方法は、子宮頸ガンを有する患者に、治療有効量の化合物、好ましくは抗体、そして最も好ましくはモノクローナル抗体（これは、標的子宮頸ガン関連タンパク質に特異的に結合し、それによりそのタンパク質を不活化する）を投与する工程を包含する。標的タンパク質は、標準的なポリアクリルアミドゲル電気泳動技術によって決定される場合に、約44,900ダルトン～約69,400ダルトンの分子量、および標準的な等電点電気泳動技術によって決定される場合に、約5.1～約6.6の等電点を有するとして特徴づけられ、そしてここで標的タンパク質は、二次元ゲル電気泳動により決定される場合に、正常ヒト子宮頸部細胞においてよりもヒト子宮頸ガン細胞において高いレベルで検出可能な非クロマチンタンパク質としてさらに特徴づけられる。同様に、化合物は、標的子宮頸ガン関連タンパク質の生物学的活性を阻害または低減する小分子（例えば、小有機分子）を含み得ることが意図される。

別の局面において、本発明は、子宮頸ガンを処置するための別の方法を提供する。方法は、子宮頸ガンを有すると診断される患者に、インビボで標的子宮頸ガン関連タンパク質の発現を低減し、それによりインビボで標的タンパク質の発現を低減する治療有効量の化合物を投与する工程を包含する。好ましい実施態様において、化合物は、アンチセンス核酸配列またはアンチセンスペプチド核酸（PNA）分子（少なくとも標的タンパク質の一部をコードする核酸配列に相補的な）のような配列を含有する核酸塩基である。投与の後、アンチセンス核酸配列またはアンチセンスPNA分子は、標的タンパク質を少なくとも一部コードする核酸配列に結合し、それにより標的子宮頸ガン関連タンパク質のインビボ発現を低減する。

従って、本発明は、個体における子宮頸ガンの検出および処置のための広範な方法および組成物を提供する。詳細には、本発明は、個体における子宮頸ガンの特異的かつ早期の（好ましくは転移が起こる前の）検出を可能にする子宮頸ガン関連タンパク質を提供する。さらに、本発明は、個体における子宮頸ガンの検出において有用なキットを提供する。さらに、本発明は、子宮頸ガンを処置するため、およびこのような処置の効力をモニターするために、子宮頸ガン関連タンパク質を標的および指標として利用する方法を提供する。本発明のこれらおよび他の多くのさらなる局面および利点は、以下の図面、詳細な説明、およびそれに続く請求の範囲を考慮して明らかになる。

【図面の簡単な説明】

図1aは、子宮頸ガン組織サンプルから単離された核マトリックスタンパク質の高分解能二次元ゲル電気泳動パターンである。腫瘍関連タンパク質が円で囲まれ、そして表2に列挙するタンパク質CvC-1～CvC-5に対応する参照番号1～5を印付けされる。

図1bは、正常子宮頸部組織サンプルから単離された核マトリックスタンパク質の高分解能二次元ゲル電気泳動パターンである。参照として、図1aのCvC-1～CvC-5タンパク質に対応する相対的な位置が円で囲まれ、そして参照番号1～5を印付けされる。

図2aは、子宮頸ガン由来細胞株C33Aから単離された核マトリックスタンパク質の高分解能二次元ゲル電気泳動パターンである。腫瘍関連タンパク質CvC-2およびCvC-5が円で囲まれ、そして参照番号2および5を印付けされる。

図2bは、CaSki細胞から単離された核マトリックスタンパク質の高分解能二次元ゲル電気泳動パターンである。腫瘍関連タンパク質CvC-1およびCvC-3が円で囲まれ、そして参照番号1および3を印付けされる。

上記の図の各々について、分子量標準を縦軸（ $M_r \times 10^3$ ）上に示し、そして等電点を横軸に示す。

10

20

30

40

50

発明の詳細な説明

本発明は、子宮頸ガンの検出および処置のための方法および組成物を提供する。本発明は、二次元ゲル電気泳動によって決定される場合に、一般に正常子宮頸部細胞においてよりも、ガン性子宮頸部細胞において検出可能により高いレベルで存在する子宮頸ガン関連タンパク質の発見に部分的に基づく。

子宮頸ガン関連タンパク質は、子宮頸ガンの検出に有用なマーカータンパク質として、または子宮頸ガンの治療のための標的タンパク質として作用し得る。例えば、マーカータンパク質および結合部分（例えば、マーカータンパク質に結合する抗体、またはマーカータンパク質をコードする核酸配列にハイブリダイズする核酸プローブ）は、個体における子宮頸ガンの存在を検出するために使用され得ることが意図される。さらに、当業者は、例えば、インビボで標的タンパク質に結合し、そしてその生物学的活性を低減もしくは排除する、個体に投与し得る抗体；標的タンパク質をコードする遺伝子もしくは遺伝子転写物にハイブリダイズし、それによりインビボでの標的タンパク質の発現を低減する核酸配列もしくはペプチド核酸配列；または標的タンパク質もしくは他の細胞部分（例えば、標的タンパク質に対するレセプター）と相互作用し、それにより標的タンパク質の生物学的活性を低減もしくは排除する低分子（例えば、有機分子）を含む子宮頸ガンを処置するための新規の治療剤を製造し得ることが意図される。

子宮頸ガン関連タンパク質を単離するための方法、子宮頸ガン関連タンパク質をマーカーとして使用して子宮頸ガンを検出するための方法、および子宮頸ガン関連タンパク質をガン治療のための標的として使用して、子宮頸ガンに冒された個体を処置するための方法を以下に示す。

1. 子宮頸ガン関連タンパク質の同定および精製

本明細書中で開示される本発明のマーカータンパク質は、(i) タンパク質を、正常子宮頸部組織から、および子宮頸ガン組織から、核マトリックス精製プロトコル（例えば、米国特許第4,882,268号および同第4,885,236号、もしくはFeyら（1986）前出に一般的に記載されるもの）を使用して単離し、(ii) 得られる核マトリックスタンパク質調製物を2-Dゲル電気泳動によって分画し、(iii) 得られるタンパク質パターンを、例えば、銀染色によって可視化し、そして(iv) 得られる2-Dゲル電気泳動図上のポリペプチドスポット（これは、一般的に、子宮頸ガン細胞から単離されるサンプル中で検出可能であるが、正常子宮頸部細胞から単離されたサンプル中では検出可能でない）を同定することによって同定される。

子宮頸ガン組織に関連するマーカータンパク質は、Feyら（Feyら（1986）前出）の方法の改変を使用して本明細書中に記載されるように単離された。簡単には、子宮頸ガン組織は、小片（1mm³）に刻まれ、そしてテフロン乳棒で氷上でホモジナイズされ、そして0.5% Triton-X-100、バナジルリボシド（vanadyl riboside）複合体、およびプロテアーゼインヒビターカクテル（フッ化フェニルメチルスルホニル、アプロチニン、およびロイペプチン）を含有する緩衝化溶液で処理されて脂質および可溶性タンパク質が除去される。細胞株由来の腫瘍細胞は、トリプシン処理によって回収され、そしてホモジナイズされた腫瘍組織についてと同じ様式で処理され得る。間質の凝集物は、ホモジネートを、250ミクロンのナイロンスクリーンを通して濾過し、続いて遠心分離工程によって除去される。

可溶性細胞骨格タンパク質は、ペレットを、250mM (NH₄)₂SO₄、0.5% Triton-X-100、バナジルリボシド複合体、およびプロテアーゼインヒビターカクテルを含有する抽出緩衝液中に10分間氷上でインキュベートし、その後遠心分離することによって除去される。クロマチンは、ペレットを、プロテアーゼインヒビターカクテルを含有する緩衝化溶液中のDNase I中で、45分間25℃でインキュベートすることによって除去される。

標的タンパク質および中間径フィラメントを含有する残りのペレット画分は、8 M尿素、プロテアーゼインヒビターカクテル、および1% 2-メルカプトエタノールを含有する分解緩衝液中で可溶化される。不溶性の夾雑物（主に、炭水化物および細胞外マトリックス）は、超遠心分離によって除去される。中間径フィラメントは、プロテアーゼインヒビターカクテルを含有する構築緩衝液中での透析による尿素的除去の際の再構築を可能にし、そ

して超遠心分離によって除去され、それによって上清画分中に標的タンパク質が残る。タンパク質濃度は、Coomassie Plus Protein Assay Kit (Pierce Chemicals, Rockford, IL) によって、ウシガンマグロブリン標準を使用して決定され得る。タンパク質は、80%エタノール中で迅速に沈澱され、そして-80℃で使用まで保存される。

同定した後、得られた子宮頸ガン関連タンパク質は、核マトリックスタンパク質調製物(例えば、上記のような調製物)を調製し、得られるタンパク質を2-Dゲル上で電気泳動し、そして可視化のいくつかの手段の後、目的のタンパク質を得られる2-Dゲルから単離することによって単離されることが意図される。あるいは、マーカータンパク質は、一旦同定されると、当業者に周知の標準的なタンパク質精製方法論(例えば、アフィニティークロマトグラフィー)を使用して単離され、実質的に純粋なマーカータンパク質を生じ得ることが意図される。本明細書中で使用される用語「実質的に純粋な」は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)によって決定された場合、少なくとも80%純粋を意味すると理解される。

2. 子宮頸ガンの検出

一旦、子宮頸ガン関連タンパク質が同定されると、それらは個体が子宮頸ガンおよび/または子宮頸部形成異常を有するか否かを決定するためのマーカーとして使用され得る。有する場合には、適切な検出方法が使用されて、疾患の状態をモニターし得る。

マーカータンパク質を使用して、当業者は、ヒトにおける子宮頸ガンを検出するための種々の検出方法を作製し得る。方法は、代表的には、いくつかの手段によって、ヒトの組織または体液サンプル中に1つ以上の子宮頸ガン関連タンパク質の存在を検出する工程を包含する。ヒトにおける子宮頸ガンを検出するための方法の精度および/または信頼度は、予め選択された組織または体液サンプル中で複数の子宮頸ガン関連タンパク質の存在を検出することによってさらに増強され得る。検出工程は、本明細書中以下に記載される1つ以上のプロトコルを包含し得る。

2.A. タンパク質検出法

サンプル中のマーカータンパク質は、マーカータンパク質に特異的に結合し得る結合部分と反応され得る。結合部分は、例えば、リガンド-レセプター対(すなわち、特異的結合相互作用を有し得る分子の対)のメンバーを含み得る。結合部分は、例えば、特異的結合対のメンバー(例えば、抗体-抗原、酵素-基質、核酸-核酸、タンパク質-核酸、タンパク質-タンパク質、または当該分野で公知の他の特異的結合対)を含み得る。標的タンパク質に対する増強された親和性を有する結合タンパク質が設計され得る。必要に応じて、結合部分は、検出可能な標識(例えば、酵素、蛍光、放射能、リン光、または有色粒子標識)と連結され得る。標識された複合体は、例えば、視覚的に、または分光光度計もしくは他の検出器を用いて検出され得る。

マーカータンパク質はまた、当該分野で利用可能なゲル電気泳動技術を用いて検出され得る。二次元ゲル電気泳動において、タンパク質は、その等電点に従ってまずpH勾配ゲルにおいて分離される。次いで、得られるゲルは、第二のポリアクリルアミドゲル上に置かれ、そしてタンパク質は分子量に従って分離される(例えば、O'Farrell (1975) J. Biol. Chem. 250: 4007-4021を参照のこと)。

1つ以上のマーカータンパク質が、まず子宮頸ガンを有すると疑われる個体から得たサンプルからタンパク質を単離し、次いでそのタンパク質を二次元ゲル電気泳動によって分離して、特徴的な二次元ゲル電気泳動パターンを生成することによって検出され得る。次いで、そのパターンは、正常細胞またはガン細胞から単離されたタンパク質を、同一または類似の条件下で分離することによって生成される標準的なゲルパターンと比較され得る。標準は、電気泳動パターンの電氣的データベース中に保存されるか、そこで得られ得る。二次元ゲルにおける子宮頸ガン関連タンパク質の存在は、試験されるサンプル中の子宮頸ガンの存在の指標を提供する。二次元ゲル電気泳動パターンにおける2つ以上のタンパク質の検出は、アッセイの精度をさらに増強する。二次元ゲル上での複数の(例えば、2~5)子宮頸ガン関連タンパク質の存在は、サンプル中の子宮頸ガンの存在の強力な指標を提供する。従って、アッセイは、子宮頸ガンの早期の検出および処置を可能にする。

2B. イムノアッセイ

マーカー子宮頸ガン関連タンパク質はまた、当該分野で利用可能な広範囲のイムノアッセイ技術のいずれかを使用して検出され得る。例えば、当業者は、サンドイッチイムノアッセイ形式を使用して、体液サンプル中の子宮頸ガンを検出し得る。あるいは、当業者は、1つ以上の標識結合タンパク質を使用して組織サンプル（例えば、パパニコラウスミア）中の子宮頸ガン関連タンパク質の存在を検出するための従来の免疫-組織化学手順を使用し得る（以下の実施例5を参照のこと）。

サンドイッチイムノアッセイにおいて、マーカータンパク質を結合し得る2つの抗体（例えば、固体支持体に固定される抗体および溶液中に遊離し、そして検出可能な化学化合物で標識される抗体）が、一般的に使用される。第2の抗体のために使用され得る化学標識の例には、放射性同位元素、蛍光性化合物、および酵素または反応物もしくは酵素基質に曝露された場合、呈色された生成物または電気化学的に活性な生成物を生じる他の分子が挙げられる。マーカータンパク質を含むサンプルがこの系に置かれた場合、マーカータンパク質は、固定化した抗体および標識した抗体の両方に結合し、支持体表面上で「サンドイッチ」免疫複合体を形成する。複合体化タンパク質は、非結合サンプル成分および過剰の標識抗体を洗い去り、そして支持体表面上でタンパク質に複合体化した標識抗体の量を測定することによって検出される。

良好な検出限界を有する標識が使用される場合、サンドイッチイムノアッセイおよび組織免疫組織化学手順の両方が、非常に特異的であり、そして極めて感度が良い。免疫学的なアッセイ設計、理論、およびプロトコルの詳細な総説は当該分野の多くのテキストに見出され得る。これには、「Practical Immunology」, Butt, W.R. 編, (1984) Marcel Dekker, New Yorkおよび「Antibodies, A Laboratory Approach」Harlowら 編 (1988) Cold Spring Harbor Laboratoryが挙げられる。

一般に、イムノアッセイ設計の考慮は、標的タンパク質に対して十分に高い結合特異性を有し、非特異的な相互作用の産物から確実に区別され得る複合体を形成する抗体（例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体）の調製を含む。本明細書中で使用される用語「抗体」は、結合タンパク質（例えば、抗体または標的タンパク質に対する適切な結合親和性および特異性を有する免疫グロブリン可変領域様結合ドメインを含む他のタンパク質）を意味することが理解される。抗体結合特異性が高ければ高い程、検出され得る標的タンパク質濃度が低くなる。好ましい結合特異性は、結合タンパク質が標的タンパク質に対して約 10^5M^{-1} より大きい、好ましくは 10^7M^{-1} より大きい結合親和性を有するような特異性である。

個体における子宮頸ガンを検出するためのアッセイにおいて有用な単離された標的子宮頸ガン関連タンパク質に対する抗体は、当該分野で周知で、そして記載された標準的な免疫学的手順を使用して作製され得る。例えば、Practical Immunology, Butt, N.R. 編, Marcel Dekker, NY, 1984を参照のこと。簡略には、単離された標的タンパク質を使用して、異種宿主（例えば、マウス、ヤギ、または他の適切な哺乳動物）において抗体を惹起し得る。

マーカータンパク質は、宿主において抗体産生を増強し得る適切なアジュバントと組み合わせられ、例えば、腹腔内投与によって宿主に注射される。宿主の免疫応答を刺激するのに適切な任意のアジュバントが使用され得る。通常使用されるアジュバントは、フロイントの完全アジュバント（殺滅され、そして乾燥された微生物細胞を含み、そして例えば、Calbiochem Corp., San Diego、または、Gibco, Grand Island, NYから入手可能なエマルジョン）である。複数の抗原注射が所望される場合、後続の注射は、不完全アジュバント（例えば、無細胞エマルジョン）と組み合わせた抗原を含む。

ポリクローナル抗体は、目的のタンパク質に対する抗体を含む血清を取り出すことによって抗体産生宿主から単離され得る。モノクローナル抗体は、所望の抗体を産生する宿主細胞を単離する工程、これらの細胞を免疫学の分野で公知の標準的な手順を使用してミエローマ細胞と融合する工程、および標的タンパク質と特異的に反応し、そして所望の結合親和性を有する雑種細胞（ハイブリドーマ）をスクリーニングする工程によって生成され得

10

20

30

40

50

る。

抗体結合ドメインはまた、生合成的に生成され得、そして標的タンパク質上の好適なエピトープとの結合親和性を増強するために結合ドメインのアミノ酸配列は操作され得る。特異的抗体方法論は十分に理解され、そして文献に記載されている。それらの調製のより詳細な説明は、例えば、「Practical Immunology」(1984)前出)に見出され得る。

さらに、BABSまたはsFvとして当該分野で公知でもある、遺伝子操作された生合成抗体結合部位が、本発明の実施において使用され得る。(i)非共有結合またはジスルフィド結合した合成 V_H および V_L ダイマー、(ii)共有結合した V_H - V_L 単鎖結合部位、(iii)単一の V_H または V_L ドメイン、または(iv)単鎖抗体結合部位を含むBABSを作製し、そして使用するための方法は、例えば、米国特許第5,091,513号；同第5,132,405号；同第4,704,692号；および同第4,946,778号に開示されている。これらの開示は参考として援用される。さらに、子宮頸ガン関連タンパク質に必要な特異性を有するBABSは、コンビナトリアル遺伝子ライブラリー由来のファージ抗体クローニングによって得られ得る(例えば、Clacksonら(1991)Nature 352: 624-628を参照のこと)。簡略には、ファージライブラリー(その各々は、そのコート表面上に、単離された子宮頸ガン関連タンパク質またはそれらのフラグメントで予め免疫化されたマウスから得られた可変領域遺伝子配列によってコードされる免疫グロブリン可変領域を有するBABSを発現する)は、固定化された子宮頸ガン関連タンパク質に対する結合活性についてスクリーニングされる。固定化された子宮頸ガン関連タンパク質に結合するファージは回収され、そしてBABSをコードする遺伝子は配列決定される。次いで、目的のBABSをコードする得られた核酸配列は従来の発現系において発現され、BABSタンパク質を生成し得る。

単離された子宮頸ガン関連タンパク質はまた、組織または体液サンプル中のこのタンパク質のレベルをモニターする診断的かつ他の組織を評価するキットおよびアッセイの開発のために使用され得る。例えば、キットは、抗体、または子宮頸ガン関連タンパク質と特異的に結合し、そして組織もしくは体液サンプル中の子宮頸ガン関連タンパク質の存在および/もしくは濃度を検出および/もしくは定量化することを可能にする他の特異的結合タンパク質を含み得る。

子宮頸ガン関連タンパク質を検出するに適切なキットは、例えば、容器または評価されるべきサンプルを捕獲するための他の手段、ならびにサンプル中の本明細書中で記載される1つ以上の子宮頸ガン関連タンパク質の存在を検出および/または定量化するための手段を含むことが意図される。本明細書中で使用される場合、1つの実施態様において「検出するための手段」は、これらのタンパク質に対して特異的である1つ以上の抗体および、例えば、本明細書中で記載される標準的なサンドイッチイムノアッセイによって、これらのタンパク質に対する抗体の結合を検出するための手段を含む。細胞(例えば、組織サンプル由来)内のタンパク質の存在が検出される場合、キットはまた、細胞内タンパク質を曝露するために細胞構造を破壊するための手段を含み得る。

2.C. 核酸ベースのアッセイ

個体における子宮頸ガンの存在はまた、組織または体液サンプル中で子宮頸ガン関連タンパク質をコードする核酸分子を検出することによって決定され得る。当業者に周知の方法を使用して、本発明の子宮頸ガン関連タンパク質は配列決定され得、次いで決定された配列に基づいて、オリゴヌクレオチドプローブがcDNAライブラリーをスクリーニングするために設計され得る(例えば、Maniatisら(1989)前出を参照のこと)。

マーカー子宮頸部関連タンパク質をコードする標的核酸分子が、標的核酸を特異的に結合し得る標識結合部分を使用して検出され得る。結合部分は、例えば、タンパク質、核酸、ペプチド核酸を含み得る。さらに、標的核酸(例えば、子宮頸ガン関連タンパク質をコードするmRNA)は、例えば、標識したオリゴヌクレオチド(例えば、標的核酸の少なくとも一部に相補的な核酸フラグメントおよび標的核酸の少なくとも一部と特異的にハイブリダイズし得る核酸フラグメント)を使用するノーザンブロット分析を行うことによって検出され得る。任意の長さのオリゴヌクレオチドがmRNA転写物をハイブリダイズするために利用され得るが、代表的には8~100ヌクレオチドの範囲内、好ましくは15~50ヌクレオチ

ド範囲内のオリゴヌクレオチドが、標準的なハイブリダイゼーションアッセイにおいて最も有用であると予想される。

標的核酸にハイブリダイズするために選択されるオリゴヌクレオチドは、化学的に合成されようと組換えDNA方法論によって合成されようと、単離され、そして標準的な技術を使用して精製され、次いで好ましくは標準的な標識標識プロトコルを使用して（例えば、 ^{35}S または ^{32}P で）標識される。次いで、標的核酸を含むサンプルは、電気泳動ゲル上で泳動され、分散した核酸をニトロセルロースフィルターに移行させ、そして標識オリゴヌクレオチドが、Maniatisら（1989）前出に記載されるような、適切なハイブリダイズ条件（例えば42℃で50%ホルムアミド、5×SSPE、2×Denhardt溶液、0.1% SDS）下でフィルターへ曝露される。当該分野で公知の他の有用な手順は、溶液ハイブリダイゼーション、ならびにドットアンドスロット（dot and slot）RNAハイブリダイゼーションを含む。次いで、サンプル中に存在する標的核酸の量が、当該分野で公知の標準的な手順を使用して、ハイブリダイズしたフラグメントの放射活性を測定することによって、必要に応じて定量化される。

さらに、オリゴヌクレオチドはまた、標的タンパク質ファミリーのメンバーをコードする他の配列を同定するために使用され得る。本明細書中で記載されるタンパク質をコードする核酸配列と結合する遺伝子配列を同定するために、例えば、タンパク質コード配列の上流または下流に存在する非コード配列（これらは、これらの遺伝子の発現において機能的な役割を果たし得る）を同定するために方法論はまた使用され得る。さらに、結合アッセイは、子宮頸ガン関連タンパク質をコードする核酸と特異的に相互作用し得るタンパク質（これは、例えば、タンパク質の遺伝子調節または遺伝子発現に関与し得る）を同定および検出するために行われ得る。さらなる実施態様において、本明細書中で記載されるアッセイは、子宮頸ガン関連タンパク質を認識し、そしてそれにより特異的に結合され得る配列を含む核酸分子を同定および検出するために使用され得る。

さらに、適切なオリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせ（すなわち、1つより多いプライマー）を使用して、当業者は、標準的なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）手順によって（例えば、定量的PCRによって）インピボで標的遺伝子の発現のレベルを決定し得ることが予想される。従来のPCRベースのアッセイは、例えば、Innesら（1990）「PCR Protocols ; A guide to methods and Applications」、Academic Press and Innesら（1995）「PCR Strategies」Academic Press, San Diego, CAにおいて考察されている。

3. 子宮頸ガン関連タンパク質とインピボで相互作用するタンパク質の同定

さらに、当業者は、以下に記載される手順のような手順を使用して、本明細書中で記載される子宮頸ガン関連タンパク質とインピボで相互作用する他の分子を同定し得ることが意図される。このような分子はまた、化学療法のための潜在的な標的を提供し得る。

例示のために、子宮頸ガン関連タンパク質と相互作用し得るタンパク質またはペプチドをコードするcDNAが、Durfeeら（1993）Genes&Develop. 7:555-559（この開示は本明細書中で参考として援用される）に報告されるように、ツーハイブリッドアッセイを使用して決定され得る。ツーハイブリッドシステムの原理は、2つのタンパク質の非共有結合的な相互作用が、このプロセスで機能するドメインへのそれらの共有結合のために、これらのタンパク質が通常には直接的な役割を果たさないプロセス（転写）を誘因することである。例えば、ツーハイブリッドアッセイにおいて、レポーター遺伝子の検出可能な発現は、2つの融合タンパク質（1つはDNA結合ドメインを含み、そして1つは転写開始ドメインを含む）が相互作用する場合に生じる。

当業者は、1つ以上のレポーター遺伝子を含む宿主細胞（例えば、Durfeeら（1993）前出に報告される、酵母株Y153）を使用し得る。この株は、染色体に位置する2つのレポーター遺伝子（その発現はGal4によって調節される）を有する。第1のレポーター遺伝子は、Gal4プロモーターの制御下のE. coli lacZ遺伝子である。第2のレポーター遺伝子は、選択可能なHIS3遺伝子である。他の有用なレポーター遺伝子は、例えば、ルシフェラーゼ遺伝子、LEU2遺伝子、およびGFP（緑色蛍光タンパク質）遺伝子を含み得る。

2つのセットのプラスミドが、ツーハイブリッドシステムにおいて使用される。プラスミ

10

20

30

40

50

ドの一方のセットは、子宮頸ガン関連タンパク質をコードするDNAにインフレームで融合されたGal4 DNA結合ドメインをコードするDNAを含む。プラスミドの他方のセットは、ヒトリンパ球から構築されたヒトcDNAライブラリーの一部に融合されたGal4活性化ドメインをコードするDNAを含む。第1のセットのプラスミドからの発現は、Gal4 DNA-結合ドメインおよび子宮頸ガン関連タンパク質を含む融合タンパク質を生じる。第2のセットのプラスミドからの発現は、リンパ球cDNAライブラリー由来の発現産物に融合された転写活性化タンパク質を生成する。2つのプラスミドが、gal欠損宿主細胞（例えば、上記の酵母Y153細胞）中に形質転換された場合、Gal DNA結合ドメインと転写活性化ドメインの相互作用が、DNA結合ドメインに融合された子宮頸ガン関連タンパク質が、転写活性化ドメインに融合したリンパ球cDNAライブラリーから発現されたタンパク質に結合する場合のみ生じる。子宮頸ガン関連タンパク質とそのインビボ結合パートナーとの間のタンパク質-タンパク質相互作用の結果として、検出可能なレベルのレポーター遺伝子発現が生じる。

子宮頸ガン関連タンパク質とインビボで相互作用する分子を同定することに加えて、当業者はまた、子宮頸ガン関連タンパク質とそのインビボ結合パートナーとの間の特異的な相互作用を変化または阻害する分子（例えば、小分子）をスクリーニングし得る。

例えば、宿主細胞は、上記のような、適切なDNA結合ドメイン/子宮頸ガン関連タンパク質ハイブリッドをコードするDNA、および翻訳活性化ドメイン/推定子宮頸ガン関連タンパク質結合パートナーをコードするDNAでトランスフェクトされ得る。宿主細胞はまた、転写因子DNA結合ドメインによって認識されるcis作用転写活性化エレメントと作動可能に結合した適切なレポーター遺伝子を含む。このシステムにおけるレポーター遺伝子発現のレベルがアッセイされる。次いで、宿主細胞は、候補分子に曝露され、そしてレポーター遺伝子発現のレベルが検出される。レポーター遺伝子発現における減少は、子宮頸ガン関連タンパク質およびそのインビボ結合パートナーに関する複合体形成または複合体安定性を妨害する候補分子の能力の指標である。コントロールとして、他の関連しないタンパク質-タンパク質複合体を妨害する候補分子の能力もまた試験される。子宮頸ガン関連タンパク質/結合パートナー相互作用を特異的に阻害し得るが、他のタンパク質-タンパク質相互作用を阻害し得ない分子が、生成およびさらなる分析のための候補として同定される。一旦、潜在的な候補が同定されたら、細胞周期および細胞複製の調節におけるその効率が、標準的な細胞周期モデル系においてアッセイされ得る。

候補分子が下記のように生成され得る。例えば、候補分子をコードするDNAが当該分野で十分に記載されている従来の技術（例えば、Maniatis（1989）前出を参照のこと）を使用して種々の発現ベクターのいずれかに挿入され得、そして適切な宿主細胞中へトランスフェクトされ、組換えタンパク質（これは、全長形態および短縮形態の両方を含む）を生成する。有用な宿主細胞には、*E. coli*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、昆虫/バキュロウイルス細胞系、ミエローマ細胞、種々の他の哺乳動物細胞が挙げられる。好ましくは、このようなタンパク質の全長形態は、本明細書中で開示されるように、哺乳動物細胞で発現される。好ましくは、ヌクレオチド配列はまた、例えば、ラージT抗原（これは、当該分野で十分に特徴付けられている）の8アミノ酸核標的化配列をコードする配列を使用して、翻訳された配列を核へ標的化するための配列を含む。さらに、ベクターは、組換えタンパク質の正しい発現を促進するための種々の配列を含み得る。これには、転写プロモーター配列および転写終結配列、エンハンサー配列、好適なりボソーム結合部位配列、好適なmRNAリーダー配列、好適なタンパク質プロセッシング配列、タンパク質分泌のための好適なシグナル配列などが挙げられる。目的の遺伝子をコードするDNA配列はまた、潜在的阻害配列を除去するために、または望ましくない二次構造形成を最少にするために操作され得る。当業者によって理解されるように、組換えタンパク質はまた、融合タンパク質として発現され得る。

翻訳後、タンパク質は、細胞自身から精製され得るか、または培養培地から回収され得る。DNAはまた、組換えタンパク質の発現および/または精製を助ける配列を含み得る。DNAは、直接発現され得るか、または容易に切断可能な融合連結部を有する融合タンパク質の一部として発現され得る。

DNAはまた、適切な哺乳動物細胞宿主において発現され得る。有用な宿主には、線維芽細胞3T3細胞（例えば、CRL 1658からのNIH3T3）、COS（サル腎臓ATCC、CRL-1650）またはCHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞（例えば、Chasin（1980）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 77:4216-4222からのCHO-DXB11）、ミンク肺上皮細胞（MV1Lu）、ヒト包皮線維芽細胞、ヒトグリア芽細胞腫、および奇形癌細胞が挙げられる。他の有用な真核生物細胞系には、酵母細胞、昆虫／バキュロウイルス系、またはミエローマ細胞が挙げられる。

候補分子を発現するために、DNAは、適切なプロモーター配列／エンハンサー配列および3'終結配列とともに適切な市販のベクターの挿入部位へサブクローン化される。有用なプロモーター／エンハンサー配列組み合わせには、例えば、pCDM8上に存在するCMVプロモーター（ヒトサイトメガロウイルス（MIE）プロモーター）、ならびにラウス肉腫ウイルスLTRエンハンサー配列によってブースト（boost）される乳癌ウイルスプロモーター（MMTV）（例えば、Clontech, Inc., Palo Alto）が挙げられる。有用な誘導可能なプロモーターには、例えば、 Zn^{2+} 誘導可能プロモーター（例えば、 Zn^{2+} メタロチオネインプロモーター（Wranaら（1992）Cell 71:1003-1014）が挙げられる。他の誘導可能なプロモーターは当該分野で周知であり、そして類似の成功率で使用され得る。発現はまた、trans活性化エンハンサー配列を使用してさらに増強され得る。好ましくは、プラスミドはまた、適切なプロモーター（例えば、SV40初期プロモーター（ATCC#37148）制御下の増幅可能なマーカー（例えば、DHFR）を含む。トランスフェクション、細胞培養、遺伝子増幅、およびタンパク質発現条件は当該分野で周知の標準的条件（例えば、Ausubelら編（1989）「Current Protocols in Molecular Biology」John Wiley&Sons, NY.に記載される条件）である。

簡略には、トランスフェクトされた細胞を5～10%の透析したウシ胎児血清（dFCS）を含む培地中で培養し、そして安定にトランスフェクトされた高発現細胞株を増幅によって得、そしてサブクローンし、そして標準的なウェスタンブロット分析およびノーザンブロット分析によって評価する。サザンブロットもまた、組み込まれた配列の状態およびそれらのコピー数増幅の程度を評価するために使用され得る。

次いで、発現された候補タンパク質は、標準的な手順を使用して精製される。現在好適な方法論は、アフィニティーカラム（例えば、リガンドアフィニティーカラムまたは抗体アフィニティーカラム）を使用する。次いで、カラムを洗浄し、そして候補分子を、漸増するイオン強度の勾配、pHの変化、または緩やかな界面活性剤の添加で選択的に溶出する。子宮頸ガン関連タンパク質に結合する候補分子に加えて、子宮頸ガン関連タンパク質自身が、同様にこのような組換えDNA技術を使用して産生され得ることが理解される。

4. 子宮頸ガン治療および治療をモニターするための方法

子宮頸ガン関連タンパク質、および子宮頸ガン関連タンパク質と相互作用するタンパク質の同定後に、当業者は、子宮頸ガンを処置するための種々の治療を開発し得る。本明細書中に記載されるマーカータンパク質は、正常子宮頸部細胞に比較して子宮頸ガン細胞において検出可能に高いレベルで存在するので、当業者は、例えば、ガン化学療法のための標的分子として、マーカータンパク質、および／またはマーカータンパク質をコードする核酸を用い得る。

4. A. アンチセンスベースの治療薬

意図される特に有用なガン治療薬は、マーカータンパク質をコードする遺伝子の一部もしくは全部、またはマーカータンパク質をコードする転写物の一部もしくは全部に相補的であり、そしてそれに生理学的条件下でハイブリダイズし得、それによってマーカータンパク質遺伝子の転写および／または翻訳を減少もしくは阻害し得る、オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列である。あるいは、同じ技術は、子宮頸ガン関連タンパク質と相互作用するタンパク質の転写および／または翻訳を減少または阻害するために適用され得る。

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、正常および異常細胞における遺伝子発現を阻害するために広く使用されている。例えば、アンチセンス理論の関連する総説および確立されたプロトコルについては、Steinら、（1988）Cancer Res. 48:2659-2668を参照のこと。さらに、アンチセンスベースの治療薬としてのペプチド核酸の合成および使用は、PCT公開

10

20

30

40

50

公報PCT/EP92/01219（1992年11月26日公開）、PCT/US92/10921（1993年6月24日公開）、およびPCT/US94/013523（1995年6月1日公開）（その開示は本明細書に参考として援用される）に記載されている。従って、アンチセンスベースの治療薬は、化学療法の一部として、単独でまたは他の治療薬との組み合わせのいずれかで使用され得る。

アンチセンスオリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸配列は、遺伝子および/またはmRNA転写物にハイブリダイズし得、それゆえ、本明細書中に記載されるタンパク質の転写および/または翻訳を阻害するために使用され得る。しかし、オリゴリボヌクレオチド配列は、一般に、デオキシリボヌクレオチド配列よりもリボヌクレアーゼによる酵素的攻撃に感受性であることが理解される。従って、インビボ治療用途のためには、オリゴデオキシリボヌクレオチドが、オリゴリボヌクレオチドを上回って好ましい。通常の核酸配列とは異なり、ペプチド核酸配列はヌクレアーゼ分解に感受性ではなく、それゆえ、インビボにおけるより長い寿命を有しそうであることが理解される。さらに、ペプチド核酸配列は、対応するDNA配列よりも、相補的な一本鎖DNAおよびRNA鎖に強く結合することが理解される（例えば、PCT/EP92/20702（1992年11月26日公開）を参照のこと）。従って、ペプチド核酸配列は、インビボ治療用途のために好ましい。

治療的に有用なアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列は、周知であり、そして当該分野において十分に記載されている、任意の公知の化学的オリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸合成法によって合成され得る。あるいは、天然mRNA配列の一部または全部に相補的な配列は、標準的組換えDNA技術を使用して生成され得る。

マーカータンパク質全体をコードする完全なヌクレオチド配列ならびに付加的な5'および3'非翻訳配列は、マーカータンパク質の各々について既知である、および/または当該分野で周知の技術を使用して容易に決定され得るので、mRNA転写物または非コード配列の任意の部分とハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸は、従来のオリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸合成法を使用して調製され得る。

マーカータンパク質をコードするmRNA転写物の任意の部分に相補的であり、そしてそれとハイブリダイズ可能であるオリゴヌクレオチドは、原則的に、本明細書中に記載されるような標的タンパク質の翻訳の阻害において有効である。例えば、米国特許第5,098,890号（1992年3月24日発行）（その開示は本明細書に参考として援用される）に記載のように、翻訳開始コドン部位におけるまたはその付近のmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドは、翻訳を阻害するために使用され得る。さらに、翻訳開始部位から3'方向に遠すぎる配列は、可能なりボソーム「リードスルー」（それによってリボソームがアンチセンス/センス二重鎖をほどいて、メッセージの翻訳を可能にすると仮定される現象）のために、mRNA転写物とハイブリダイズすることにおいて有効性がより低くあり得ることが示唆されている。

種々の配列長のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸が、mRNA転写物にハイブリダイズさせるために使用され得る。しかし、非常に短い配列（例えば、8～15ヌクレオベース未満を含む配列）は、より低い特異性を有して結合し得る。さらに、インビボ用途については、短いオリゴヌクレオチド配列は、酵素的分解に特に感受性であり得る。上記のように、ペプチド核酸は、ヌクレアーゼ分解に耐性でありそうである。オリゴヌクレオチドおよびペプチド核酸配列が細胞に直接提供されるべきである場合、非常に長い配列は、標的細胞による減少した取り込みのために、阻害においてより低く有効であり得る。従って、オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸が標的細胞に直接提供されるべきである場合、約8～50ヌクレオベース、およびより好ましくは15～30ヌクレオベースを含むオリゴヌクレオチドおよび/またはペプチド核酸配列が、最も有利であることが意図される。

アンチセンスオリゴヌクレオチド配列を標的細胞に提供するための別の手段は遺伝子治療であり、ここで、例えば、DNA配列（好ましくは、ベクターの一部として、そしてプロモーターを伴って）は、標的細胞の内部で構成的に発現される。最近、Oellerら（Oellerら、（1992）Science 254:437-539、その開示は本明細書に参考として援用される）は、完全長ACCシンターゼ転写物に対するアンチセンス配列をコードする構成的に発現可能なDNA配列を使用する、ACCシンターゼ酵素のインビボにおける阻害を記載した。従って、アン

10

20

30

40

50

チセンスオリゴヌクレオチド配列が標的細胞に間接的に（例えば、細胞内で発現されるべき発現可能遺伝子配列の一部として）提供される場合、より長いオリゴヌクレオチド配列（実質的に全てのタンパク質コード配列に相補的な配列を含む）が有利に使用され得る。最後に、意図される治療的に有用なオリゴヌクレオチド配列はまた、天然に存在するヌクレオチドから構成される天然オリゴマーだけでなく、例えば、安定性および脂質溶解性を改善し、それによって細胞取り込みを増強するために修飾ヌクレオチドを含むオリゴマーもまた含む。例えば、増強された脂質溶解性および/またはヌクレアーゼ消化に対する耐性が、ヌクレオチド間ホスホジエステル結合においてメチル基またはイオウ原子でリン酸酸素を置換することによって生じることが知られている。ホスホロチオエート（「S-オリゴヌクレオチド」、ここで、リン酸酸素はイオウ原子によって置換されている）は、特に、ヌクレアーゼ切断に対して安定であり、脂質に可溶性であり、そして、特に直接的オリゴヌクレオチド投与のために好ましい。S-オリゴヌクレオチドは、当該分野において周知であり、そして十分に記載されている従来の合成法を使用して、化学合成され得る。

好ましい合成ヌクレオチド間結合としては、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロジチオエート、ホスフェートエステル、アルキルホスホノチオエート、ホスホルアミデート、カルバメート、カーボネート、リン酸トリエステル、アセトアミデート、およびカルボキシメチルエステルが挙げられる。さらに、1つ以上の5'-3'リン酸基が、例えば、低級アルキル鎖もしくは脂肪族基（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル）、置換アルキルおよび脂肪族基（例えば、アミノエチル、アミノプロピル、アミノヒドロキシエチル、アミノヒドロキシプロピル）、小サッカリド、またはグリコシル基を含む低分子量（例えば、15~500 Da）有機基に共有結合され得る。他の低分子量有機修飾としては、アミノ基と末端リボースとの間の、変動する数の炭素残基を有する、コレステリルまたはジアミン化合物のようなヌクレオチド間リン酸結合への付加が挙げられる。これらの結合または他の修飾を有するオリゴヌクレオチドは、当該分野において周知の方法を使用して調製され得る（例えば、米国特許第5,149,798号を参照のこと）。

マーカータンパク質の転写および/または翻訳を阻害する適切なオリゴヌクレオチドおよび/またはペプチド核酸配列は、当該分野において十分に特徴付けられている標準的インピボアッセイを使用して同定され得る。好ましくは、一定の範囲の用量が、阻害およびハイブリダイゼーションの特異性のために有効な濃度を決定するために使用される。例えば、オリゴヌクレオチドの場合、0~100 µgオリゴヌクレオチド/mlの用量範囲がアッセイされ得る。さらに、オリゴヌクレオチドは、細胞に、単一のトランスフェクションで、または一連のトランスフェクションの一部として提供され得る。アンチセンス効力は、標準的細胞計数法を使用してトランスフェクション後に経時的に細胞増殖の変化をアッセイすることによって、および/または、例えば免疫蛍光によって、マーカータンパク質の減少された発現についてアッセイすることによって決定され得る。あるいは、細胞がチミジンを取り込みそして使用する能力は、細胞分裂についてアッセイする別の標準的手段であり、そして、例えば³Hチミジンを使用して、ここで用いられ得る。有効なアンチセンス阻害は、チミジン取り込みを減少させるために十分に細胞分裂を阻害し、細胞増殖を阻害し、そして/またはマーカータンパク質の検出可能なレベルを減少すべきである。

治療的に有効なオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸の濃度は、新生物の性質および程度、使用される特定のヌクレオベース配列、オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列に対する新生物の相対的感受性、ならびにその他の因子に従って変動し得ることが予知される。所定の細胞型ならびにオリゴヌクレオチドおよび/またはペプチド核酸についての有用な範囲は、標準的用量範囲実験を実施することによって決定され得る。用量範囲実験はまた、正常細胞および悪性細胞についての毒性レベルを評価するために実施され得る。有用な濃度は10⁵細胞当たり約1~100 µg/mlの範囲であり得ることが意図される。

インピボ用途のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列は、適切な液体ビヒクルまたは賦形剤のような薬学的キャリア、および必要に応じて補助的添加物（単数または複数）と組み合わせられ得る。液体ビヒクルおよび賦形剤は従来的であり、そして市販されている。その例示は、蒸留水、生理食塩水、デキストロースの水溶液など

10

20

30

40

50

である。インビボにおけるガン治療のためには、アンチセンス配列は、好ましくは、例えば腫瘍中への直接的注射によって、悪性細胞へ直接提供され得る。あるいは、アンチセンス配列が配列を標的悪性細胞に指向させるための手段と結合されているのであれば、オリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸は全身投与され得る。

従来のキャリアを伴う投与に加えて、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列は、種々の特殊化されたオリゴヌクレオチド送達技術によって投与され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、Manninoら、(1988) BioTechnology 6:682およびFelgnerら、(1989) Bethesda Res. Lab. Focus 11:21に記載のようにリポソーム中に被包され得る。リポソーム処方物の産生において有用な脂質としては、モノグリセリド、ジグリセリド、スルファチド、リゾレシチン、リン脂質、サポニン、胆汁酸などが挙げられるがそれらに限定されない。そのようなリポソーム処方物の調製は当該分野の技術のレベル内である(例えば、米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、および同第4,737,323号を参照のこと)。本発明の薬学的組成物は、細胞中へのオリゴヌクレオチドの送達を増強するシクロデキストリンなどのような化合物をさらに含み得る。組成物が全身投与されるのでなく、むしろ標的細胞の部位において注射される場合、カチオン性界面活性剤(例えば、Lipofectin)が取り込みを増強させるために添加され得る。さらに、再構成されたウイルスエンベロープは、RNAおよびDNAを細胞に送達するために首尾良く使用されている(例えば、Aradら、(1986) Biochem. Biophys. Acta. 859:88-94を参照のこと)。

インビボにおける治療的用途のために、アンチセンスオリゴヌクレオチドおよび/またはペプチド核酸配列は、個体に、治療有効量(例えば、悪性細胞における標的タンパク質発現を減少または阻害するために十分な量)で投与される。投与される実際の投薬量は、処置の性質が現実に予防的であるか治療的であるかどうか、患者の年齢、体重、健康、投与の経路、悪性腫瘍の大きさおよび性質、ならびにその他の因子を考慮し得る。1日投薬量は、1日当たり約0.01~1,000mgの範囲であり得る。必要であれば、より多いまたはより少ない量のオリゴヌクレオチドまたはペプチド核酸配列が投与され得る。医学の分野(特に、化学療法の分野)の当業者によって理解されるように、インビボ投与のための適切な用量範囲は、臨床医にとって日常の実験となる。予備的な指針として、標的分子のインビトロにおける阻害のための有効濃度が先ず決定され得る。

4. B. 結合タンパク質ベースの治療薬

上記のように、ガンマーマーカータンパク質、またはガンマーマーカータンパク質と相互作用するタンパク質は、化学療法のための標的として使用され得る。例えば、マーカータンパク質に本質的に不可逆的に結合するように設計された結合タンパク質は、例えば、細胞に対して特異的であり、そして細胞によって吸収されることが既知でありリガンドとの結合によって、悪性細胞に提供され得る。特定の細胞および細胞型に分子を標的化するために手段は、化学療法の分野において十分に記載されている。

結合タンパク質は、当該分野において周知の技術を使用して取得および試験され得る。例えば、抗体の結合部分が有利に使用され得る。しかし、インタクトな抗体またはBABS(これは好ましくはヒト化されている)が本発明の実施において使用され得ることが意図される。本明細書中で用いられる用語「ヒト化」は、それによって非ヒト免疫グロブリン可変領域のフレームワーク領域配列がヒト可変領域配列によって置換されるプロセスを意味すると理解される。従って、そのようなヒト化結合タンパク質は、それらの非ヒト化対応物よりも弱い免疫応答を誘起することが意図される。標的タンパク質に対する高親和性(例えば、約 10^9M^{-1} より高い)を有して同定された結合タンパク質が特に有用である。あるいは、結合タンパク質をコードするDNAは、当該分野において十分に記載されている遺伝子治療プロトコルのために使用される手順に従って、細胞内で発現されるべき発現可能遺伝子の一部として、標的細胞に提供され得る。例えば、米国特許第4,497,796号、および「Gene Transfer」, Vijay R. Baichwal編, (1986)を参照のこと。一旦結合タンパク質によって結合されると、標的タンパク質は不活化されるか、またはその生物学的活性は減少され、それによって細胞分裂が阻害または遅延されることが予知される。

上記のように、インビボ用途のために適切な結合タンパク質は、医学の分野において十分に特徴付けられている生理食塩水またはその他の有用なキャリアのような適切な薬学的キャリアと組み合わされ得る。薬学的組成物は、例えば、直接的注射によって悪性細胞に直接的に提供され得るか、または、結合タンパク質がタンパク質を標的細胞に標的化するための手段と結合されているのであれば、全身的に提供され得る。最後に、適切な用量範囲および細胞毒性レベルは、標準的用量範囲実験を使用して評価され得る。治療有効濃度は、1日当たり約0.01～1,000mgの範囲であり得る。上記のように、投与される実際の投薬量は、例えば、悪性腫瘍の性質、個体の年齢、体重、および健康、ならびにその他の因子に依存して変動し得る。

4. C. 低分子ベースの治療薬

子宮頸ガン関連核マトリックスタンパク質を単離した後、当業者は、当該分野において周知の方法を使用して、低分子ライブラリー（ペプチドベースのライブラリーまたは非ペプチドベースのライブラリーのいずれか）をスクリーニングして、子宮頸ガン関連タンパク質の生物学的機能を減少または阻害する候補分子を同定し得る。低分子は、好ましくは、標的分子のインビボにおける発現を減少させることによって、または標的分子と相互作用し、それによって標的分子の生物学的活性もしくは標的分子とそのインビボにおける結合パートナーとの間の相互作用のいずれかを阻害することによって、この機能を達成する。一旦候補低分子が明らかにされると、当業者は、当該分野において周知の合理的ドラッグデザイン法を使用して、低分子の効力を増強し得ることが意図される。あるいは、当業者は、当業者が定量的構造活性関係（QSAR）を開発することを補助する種々のコンピュータプログラムを使用し得、このQSARは、新規のさらなる候補分子の設計をさらに補助する。一旦同定されると、低分子は商業的な量で生産され得、そして適切な安全性および効力の研究に供され得る。

スクリーニングアッセイは自動化され得、それによって同時の多数の低分子のスクリーニングを容易にし得ることが意図される。そのような自動化手順は、薬物スクリーニングの分野の技術のレベル内であり、それゆえ、本明細書中では論じない。候補のペプチドベースの低分子は、宿主細胞中での適切な核酸配列の発現によって、または合成有機化学を使用して産生され得る。同様に、非ペプチドベースの低分子は、当該分野で周知の従来の合成有機化学を使用して産生され得る。

上記のように、インビボ用途のために、同定された低分子は、医学の分野において十分に特徴付けられている生理食塩水またはその他の有用なキャリアのような適切な薬学的キャリアと組み合わされ得る。薬学的組成物は、例えば、直接的注射によって悪性細胞に直接的に提供され得るか、または、結合タンパク質がタンパク質を標的細胞に標的化するための手段と結合されているのであれば、全身的に提供され得る。最後に、適切な用量範囲および細胞毒性レベルは、標準的用量範囲実験を使用して評価され得る。上記のように、投与される実際の投薬量は、例えば、悪性腫瘍の性質、個体の年齢、体重、および健康、ならびにその他の因子に依存して変動し得る。

4. D. 個体における子宮頸ガンの状態をモニターするための方法

子宮頸ガンの進行または化学療法の治療的効力は、当該分野で周知の手順を使用して測定され得る。例えば、特定の化学療法剤の効力は、細胞死を経ている子宮頸ガン細胞から放出される子宮頸ガン関連タンパク質の量を測定することによって決定され得る。PCT公開公報PCT/US92/09220（1993年5月13日公開、本明細書に参考として援用される）において報告されるように、可溶性核マトリックスタンパク質およびそのフラグメントは、細胞死に際して細胞によって放出される。そのような可溶性核マトリックスタンパク質は体液中で定量され得、そして組織中での細胞死の程度または速度をモニターするために使用され得る。

例えば、細胞から放出される体液可溶性核マトリックスタンパク質またはそのフラグメントの濃度は、健常未処置組織由来の標準に対して比較される。液体サンプルは処置の間に不連続的間隔で採集され、そして標準に対して比較される。体液可溶性子宮頸ガン関連タンパク質のレベルの変化は、処置の効力（すなわち、ガン細胞死の速度）の指標となるこ

10

20

30

40

50

とが意図される。体液可溶性内部核マトリックスタンパク質の放出は、血液、血漿、尿、痰、膣分泌物、および乳滲出物において測定され得ることが意図される。

アッセイが、組織の生存性または子宮頸ガンの進行をモニターするために使用される場合、目的のサンプルにおけるマーカータンパク質またはその転写物の存在および非存在を検出する工程は間隔をおいて繰り返され、次いでこれらの値は比較され、検出される濃度の変化は、組織の状態の変化を反映する。例えば、子宮頸ガン関連タンパク質のレベルの増加は、子宮頸ガンの進行と相関し得る。アッセイが、治療の効力を評価するために使用される場合、モニターする工程は治療剤の投与または手順の後に（例えば、化学療法剤の投与後に、または放射線処置の後に）生じる。同様に、子宮頸ガン関連タンパク質のレベルの減少は、子宮頸ガンの退行と相関し得る。

10

従って、子宮頸ガンは、本明細書中に教示される子宮頸ガン関連タンパク質の存在によって同定され得る。一旦同定されると、子宮頸ガンは、子宮頸ガン関連タンパク質の発現および/または生物学的活性をインビボにおいて減少させる化合物を使用して処置され得る。さらに、本明細書において提供される方法は、疾患の進行および/または疾患の処置をモニターするために使用され得る。以下の非限定的実施例は、子宮頸ガン関連タンパク質の単離および特徴付け、ならびに子宮頸ガンの検出におけるそれらの使用のための方法の詳細を提供する。

実施例 1

子宮頸ガン組織サンプルおよび細胞株からの子宮頸ガン関連核マトリックスタンパク質の単離

20

正常およびガン性子宮頸部細胞から単離したタンパク質の銀染色2-Dゲルパターンを比較することにより、子宮頸ガン関連タンパク質を同定した。

Scientific and Ethics Committee Review Boardの承認により、Instituto Nacional de Cancerologia (Mexico City, Mexico) からの臨床的に局所的な (IB、IIまたはIII段階、International Federation of Gynecology and Obstetrics or FIGOの分類) 子宮頸ガンについて子宮摘出を受ける患者から、新鮮な子宮頸ガン組織を得た。Pittsburgh Cancer Center (Pittsburgh, PA) からのInstitutional Review Boardの承認下で少数の腫瘍組織を得た。Institutional Review Boardの承認下で、異常な子宮頸部組織病理学に関連しない原因で子宮摘出を受ける患者から、Cooperative Human Tissue Network (Columbus, OH) を介して正常な子宮頸部組織を得た。これらの実験における使用のための組織サンプルを提供した20人の患者についての臨床段階および腫瘍の組織病理学を表1に示す。腺扁平上皮ガンである1例を除いて、全腫瘍は扁平上皮ガンであった。これらの多数は、大細胞非角質化型のものであった。全患者は、病期 I B ~ III B の範囲の臨床段階を有する局部疾患を有した (表1)。

30

表1 患者の年齢、臨床段階および組織病理学

症例番号	患者の年齢	FIGO段階	組織病理学的診断		
1	37	IB	LCNKS [†]		
2	49	IB	LCKS [‡]		
3	32	IB	扁平上皮、mod. well diff. [*]	10	
4	60	IIA	LCNKS		
5	63	III	腺扁平上皮腫		
6	35	IB	LCKS		
7	44	IIIB	LCNKS		
8	31	IB	扁平上皮、poorly diff. [§]		
9	31	IB	LCNKS		
10	38	IIB	LCKS	20	
11	65	IIB	LCNKS		
12	35	IB	LCNKS		
13	43	IB	LCNKS		
14	65	III	LCNKS		
15	52	IIB	LCKS		
16	47	III	LCNKS		
17	33	IB	LCNKS	30	
18	51	IIIB	LCNKS		
19	45	IIB	LCNKS		
20	39	IIB	LCNKS		
FIGO段階	IB	IIA	IIB	III	IIIB
n	9	1	5	3	2

[†]、大細胞非角化扁平上皮ガン

[‡]、大細胞角化扁平上皮ガン

^{*}、扁平上皮ガン、中程度に十分分化したもの

[§]、扁平上皮ガン、分化不十分のもの

手術中に新鮮な組織を得、輸送培地（ゲンタマイシンおよび10%胎児ウシ血清（GIBCO）を補充したRPMI 1640）中に配置し、氷中に包装し、そして翌日配達便によりMatritech, Inc.に輸送した。迅速な輸送を手配し得なかった少数の場合には、組織標本を液体窒素中で瞬間冷凍し、そしてドライアイス上で翌日配達便によりMatritech, Inc.に輸送した。組織標本の最小のサイズは0.2グラムであった。各標本に添付された病理学報告書から診断を得た。

Feyら（（1986）上記）の方法を改変したものをを用いて、子宮頸ガン組織から核マトリックスタンパク質を単離した。サイズが約0.2g～約1.0gの範囲内の新鮮な子宮頸ガン組織標本を、20人の異なる患者から得た。組織標本を小片（1mm³）に切り刻み、そして氷上でテフロン乳鉢を用いて均質化し、そして0.5%Triton-X-100、バナジリリボシド複合体（RNaseインヒビター、Five Prime-Three Prime, Inc.）を含む緩衝液、ならびにフェニルメチルフッ化スルホニル（Sigma Chemical Co.）、アプロチニンおよびロイペプチン（Boehringer Mannheim）を含むプロテアーゼインヒビターカクテルで処理し、脂質および可溶性タンパク質を除去した。

均質物を、250ミクロンのNitexナイロンスクリーン（Tetko, Inc.）を通過させる濾過、およびその後の遠心分離工程（600×g、4、5分間）により、間質凝集体を除去した。ペレットを、250mM（NH₄）₂SO₄、0.5%TritonX-100、バナジリリボシド複合体、およびプロテアーゼインヒビターカクテルを含む抽出緩衝液中で、氷上にて10分間インキュベートし、その後遠心分離すること（600×g、4、5分間）により、可溶性細胞骨格タンパク質を除去した。

ペレットを、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む緩衝液中のDNAase（100mg/mL、Boehringer-Mannheim）中で45分間、25℃にてインキュベートすることにより、クロマチンを除去した。8M尿素、プロテアーゼインヒビターカクテル、および1%（容量/容量）2-メルカプトエタノールを含む分解緩衝液において、核マトリックスタンパク質および中間径フィラメントを含む残留ペレット画分を可溶化した。不溶性混入物（主に炭水化物および細胞外マトリックス）を超遠心分離（163,000×g、20、1時間）により除去した。150mM KCl、24mMイミダゾールHCl、5mM MgCl₂、0.125mM EGTAおよび2mMジチオスレイトール（DTT）、ならびにプロテアーゼインヒビターを含むアセンブリ緩衝液中での透析による尿素的除去により、中間径フィラメントを再アセンブリさせ、そして超遠心分離（109,000×g、15、1.5時間）により除去し、上清画分中に核マトリックスタンパク質を残した。

さらに、CaSki、ME-J80、C33A、HeLa（S3垂系統）、SiHa、C4-1、C4-11、およびHT-3子宮頸部腫瘍細胞株から、子宮頸ガン関連タンパク質を単離した。各細胞株を、アメリカンタイプカルチャーコレクション（ATCC）から得、そして5%CO₂中で37℃にて、10%胎児ウシ血清、ゲンタマイシン、ファンギゾン、および0.12%SeraExtend（Irvine Scientific）を補充したダルベッコの改変イーグル培地中で、維持した。核マトリックス抽出の研究のために、10段階の細胞培養ファクトリー（Nunc）中で約80%のコンフルエンスにまで細胞を増殖させ、トリプシン処理により収集し、均質化した腫瘍組織と同様の様式で計数し、抽出した。Coomassie Plus Protein Assay Kit（Pierce Chemical）によりウシガンマグロブリン標準を用いて、核マトリックスタンパク質のタンパク質濃度を測定した。タンパク質を直ちに80%エタノール中で沈殿させ、そして-80℃にて使用まで保存した。

次いで、O'Farrell（1975）J. Biol. Chem. 250: 4007-4021（1975）の手順に従い、Investigator 2-Dシステム（Oxford Glycosystems, Bedford, MA）での高解像度2次元ゲル電気泳動により、得られた核マトリックスタンパク質を特徴付けした。等電点電気泳動法（IEF）分析のため、9M尿素、65mM 3-[(コルアミドプロピル)ジメチルアミノ]-1-硫酸プロパン（CHAPS）、2.2%両性電解質、および140mMジチオスレイトール（DTT）を含むサンプル緩衝液中に、核マトリックスタンパク質を可溶化した。1ゲルにつき、200マイクログラムの核マトリックスタンパク質をのせた。

1mm×18mmゲル管を用いて、18,000ボルト・時間、一次元等電点電気泳動法を施行した。一次元電気泳動の後、ゲルをゲル管から押し出し、0.3M Tris塩基、0.075M Tris-HCl、3.0%SDS、50mM DTT、および0.01%プロモフェノールブルーを含む緩衝液中で2分間平衡化し、そして1mmの10%Tris-グリシン-SDS Dura c ryl（Oxford Glycosystems）高張度ポリアクリルアミド電気泳動スラブゲルの頂部に配置した。二次元スラブゲルを、1ゲルあたり16ワットにて、および12℃の一定温度にて約5時間、電気泳動した。分子量スタンダードは、ウシアルブミン（M_r66,000）、オボアルブミン（M_r45,000）、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（M_r36,000）、炭酸脱水酵素（M_r29,000）、ウシ膵臓トリブ

10

20

30

40

50

シノーゲン (M_r 24,000)、およびダイズトリブシンインヒビター (M_r 20,100) (Sigma Chemical Co.) から構成された。十分に特徴付けされた等電点を有する内部コントロールタンパク質を用いて、等電点を測定した。電気泳動の後、40%エタノール/10%酢酸を含む溶液中にゲルを固定し、その後0.5%グルタルアルデヒドを含む溶液で処理した。ゲルを十分に洗浄し、そしてRabilloudら (Rabilloudら (1992) Electrophoresis 13: 429-439) の方法により銀染色し、そしてセロファン紙の間で乾燥させた。

MasterScan Biological Imaging System (CSP, Inc., Billerica, MA) を用いて、製造業者の説明書に従って、銀染色したゲルを画像化した。デジタルフィルタリングアルゴリズムを用いて、臨界の画像データを除去することなく均一および均一でないバックグラウンドの両方を除去した。複式のガウスの最小二乗適合アルゴリズムを用いる2-Dスキャン (TM) 二次元ゲル分析およびデータベースソフトウェア (バージョン3.1) を用いて、Olsonら (1980) Anal. Biochem. 169: 49-70により報告されたように、スポットパターンをデータの最適適合モデルへと算定した。内部スタンダードからの三角法を用いて、目的の各標的タンパク質の分子量および等電点を正確に測定した。特定のソフトウェアアプリケーションモジュールを用いて翻訳濃度測定を施行し、数字およびグラフィックの報告に、分析された各ゲルについてのデータを集積した。

実施例 2

2-Dゲル上でディファレンシャルな様相を有する子宮頸ガン関連核マトリックスタンパク質の同定

上記の実施例に記載するように、正常または発ガン性子宮頸部細胞のいずれかから単離されたタンパク質を分画することにより、2-Dゲル電気泳動パターンを得た。図1aは、子宮頸部ガン組織から得られた代表的な子宮頸ガン関連核マトリックスタンパク質のパターンを示す。図1bは、正常な子宮頸部組織サンプルから得られた核マトリックスタンパク質により作製された代表的なゲルパターンを示す。ゲル当たり約600個のタンパク質を解析した。ほとんどの観察したタンパク質は、調査中の子宮頸部組織の型にかかわらず、常に存在した。

図1と2との比較から、ガンおよびガンでないサンプルにおけるほとんどのタンパク質が同一である一方、子宮頸ガンサンプルに特有の5個のタンパク質 (図1で標識されている) が存在することが明らかになる。子宮頸ガンと診断された患者から得られた20組織サンプルにおいて、CvC-1~CvC-5と称されるタンパク質を検出したが、10人の正常な個体のグループから単離された子宮頸部組織においては検出されなかった。表2は、CvC-1~CvC-5と称されたタンパク質を、それらのおよその分子量および等電点により同定する。表1に列挙される分子量および等電点値の両方は、分子量については2,000ダルトン以内の近似および正確性であり、そして等電点については0.2pI単位以内である。正常な子宮頸部組織に共通に存在するが子宮頸ガン組織に存在しないタンパク質を同定するための詳細な分析は、正常な子宮頸部組織に特異的に結合するタンパク質は1つも明らかにされなかった。

表2：子宮頸ガン関連タンパク質

ペプチド	分子量	等電点	子宮頸ガン	正常な子宮頸部
CvC-1	69,408	5.78	+	—
CvC-2	53,752	5.54	+	—
CvC-3	47,887	5.60	+	—
CvC-4	46,006	5.07	+	—
CvC-5	44,864	6.61	+	—

さらに、子宮頸ガン細胞株から単離された核マトリックスタンパク質の発現を調査し、その結果を以下の表3に要約した。上皮細胞起源の腫瘍は、間質、およびその他の要素 (例

えば、炎症性細胞を浸潤することにより得られるもの)の存在により特徴付けられることが知られている。子宮頸部上皮細胞腫瘍由来の腫瘍細胞株における核マトリックスまたは基質関連タンパク質の検出は、タンパク質が核マトリックス調製物の間質型またはその他の型の混入物の結果である可能性を減する。

子宮頸ガン細胞株由来の子宮頸ガン細胞を含むサンプルから、2-Dゲル電気泳動パターンを得た。図2aは、子宮頸ガン細胞株C33Aから得られた子宮頸ガン関連核マトリックスタンパク質パターンを示す。図2aでは、腫瘍関連タンパク質CvC-2およびCvC-5は丸で囲まれており、そして2番および5番として同定される。図2bは、正常な子宮頸部組織サンプルである子宮頸ガン細胞株CaSki由来の核マトリックスタンパク質により産生されたゲルパターンを示す。図2bでは、腫瘍関連タンパク質CvC-1およびCvC-3は丸で囲まれており、そして1番および3番として同定される。

1個以上の子宮頸部腫瘍細胞株(図2、表3)で、5個の腫瘍関連タンパク質のうち4個(CvC-1~CvC-3およびCvC-5)を何度も検出し、タンパク質の上皮起源を確認した。第5のタンパク質CvC-4の発現は可変的であったが、C33A腫瘍細胞株で検出されなかった(表3)。

表3. 子宮頸部腫瘍細胞株における子宮頸ガン関連タンパク質発現

腫瘍細胞株	腫瘍または起源の組織病理学	発現された核マトリックスタンパク質*				
		CvC-1	CvC-2	CvC-3	CvC-4	CvC-5
CaSKI [†]	類表皮	+	tr [‡]	+	—	+
SiHa	扁平上皮細胞	—	tr	+++	—	+
HeLa	腺ガン	tr	—	+++	—	+
ME-180 [†]	類表皮	—	tr	+	—	+
C33A	扁平上皮細胞	+	++	—	var [§]	+
C4-I	扁平上皮細胞	tr	—	+++	—	+
C4-II	扁平上皮細胞	—	—	—	—	tr
HT-3 [†]	類表皮	tr	—	+	—	tr

* FeyおよびPenmanの抽出方法論を使用して、アメリカンタイプカルチャーコレクションから得られた腫瘍細胞株から、核マトリックスタンパク質を抽出した。

[†] 子宮頸部に起因する転移類表皮ガンから起こされた腫瘍細胞株。

[‡] 低レベルの発現を示す。銀染色により検出。

[§] 可変的な発現を示す。銀染色により検出。

2個の、子宮頸ガン細胞に特異的な子宮頸ガン関連タンパク質を単離し、そしてマイクロシーケンス分析のためにプロセスした。

実施例3

子宮頸ガン関連核マトリックスタンパク質マーカーの特徴付け

CvC-3およびCvC-5に相当する、2-Dゲル上で検出可能な2個のタンパク質染色スポットを単離し、そのタンパク質を収集し、そしてマイクロシーケンス分析に供した(本明細書中で以下に記載の通り)。

子宮頸ガン関連ポリペプチドCvC-3およびCvC-5の配列決定のために、HeLa細胞からの核マトリックス画分を、上記のように、二次元ゲルで電気泳動した。上記のように、各ゲルに核マトリックスタンパク質単離手順により単離された300マイクログラムのタンパク質を

のせた。二次元の電気泳動の後、タンパク質を逆染色により可視化した。簡潔に言えば、ゲルを200mMイミダゾール中に10分間浸漬し、水中で1分間、その後1～2分間300mM塩化亜鉛（Fernandez-Patronら（1992）BioTechniques 12: 564-573）でリンスした。タンパク質含有スポットが現れ始めた後、ゲルを水中に配置し、そして関連のゲルスポットを摘出した。個々の子宮頸ガン関連ポリペプチドを表す単離されたゲルスポットをプールし、そして2%クエン酸中での5分間の洗浄により脱染色し、続いて100mM Tris HCl中でpH7.0にて数回洗浄することにより、ゲル片中のpHを上昇させた。

次いで、プールしたゲル断片の各セットを、等容量の2×ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）サンプル緩衝液（250mM Tris-Cl、2% SDS、20%グリセロール、0.01%プロモフェノールブルー、および10%β-メルカプトエタノール、pH6.8）で希釈し、そして75℃にて3分間インキュベートした。次いで、ゲル断片含有サンプルを氷上にて冷却し、そして4%ポリアクリルアミドスタッキング/11%ポリアクリルアミド分離SDS-PAGEゲル上にのせ、そして1×Tank緩衝液（24mM Tris-HCl、192mMグリシン、1% SDS、pH8.3）中で電気泳動し、ゲルスポットをバンドへとフォーカス（鮮鋭化）させた。分子量マーカー（BioRad#161-0304）を各ゲルに使用し、1次元および2次元ゲルにおいて観察された分子量と比較した。電気泳動に続いて、ミニゲル形式についてMatsudaira（Matsudairaら（1987）J. Biol. Chem. 262: 10035）により改変されたように、Immobilon PVDF膜（Oxford Glycosystems, Inc.）上に、これらのゲルを電気泳動プロットした（Towbinら（1979）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 76: 4350-4354）。次いで、膜をBuffalo Black（1%酢酸、40%メタノール中に0.1%）で1分間染色し、そして水でリンスした。ポリペプチドバンドを含む膜領域を滅菌小刀で摘出した。

次いで、Worcester Foundation for Biomedical ResearchのMicrochemistry Facilityにて、Hewlett Packard Model 1090M HPLCを使用して、PVDF結合ポリペプチドを、トリプシン消化ペプチドマッピングおよびマイクロシーケンシング（Fernandezら（1994）Analytical Biochem. 218: 112-117）に供した。Applied Biosystems ProCise Sequenatorで配列決定を行った結果、個々のペプチドのMALDI-TOF質量分光法により、ほとんどが確認された。質量分析のみで、またはカルボキシペプチダーゼ消化物質の質量分析により、その他のペプチドを同定した。

CvC-3ペプチドのマイクロシーケンス分析

上記の方法論を用いて、CvC-3をHeLa核マトリックスの約120の2次元ゲルから単離し、そしてマイクロシーケンス分析のために、Immobilon-PVDF膜上に再度フォーカスした。CvC-3として同定された2-Dゲル位置の銀染色により、1つのタンパク質のみ観察されたが、1次元11%ミニゲル上にそのタンパク質を再度フォーカスした結果、2個の鮮明に分離できるタンパク質のバンドが分離された。これらのタンパク質をCvC-3 11およびCvC-3Lとして標識し、そして別々にマイクロシーケンス分析に供した。トリプシン消化マップの分析は、2個の異なるタンパク質が、再度のフォーカスミニゲル上に見られた2個のバンドに含まれたことを示す。それは、その2つのペプチドのピーク保持時間でほとんど重複が観察されなかったからである。

10個の質量を、7つのCvC-3Hピークから質量分光測定によって検出した。3つのペプチドのアミノ酸配列を、2つはEdman分解によって、そして1つはカルボキシペプチダーゼ-MALDI-TOF分析によって得た。これらのペプチドについて得られた、表4に示される配列は、IEF SSP 9502として既知のタンパク質または「新規のヒト核リントタンパク質」（Honoreら（1994）前出；GenBank登録番号#L007758）と一致する。遺伝子配列から誘導される場合のこのタンパク質の完全なアミノ酸配列を、配列番号10に示す。CvC-3Hトリプシンマップについて分離されたピーク画分に由来する7つの他の質量もまた、このタンパク質由来の推定のトリプシンフラグメントのものと一致した。CvC-3H由来のトリプシンペプチドの質量相関データを、表4にまとめる。核リントタンパク質の推定の分子量は、そのヌクレオチド配列に基づけば55 kDaであるが、2-Dゲル分析によって観察されたその分子量は79 kDaである（Honoreら（1994）前出）。

表4. CvC-3H由来のトリプシンペプチドの質量相関

ピーク	観察された 質量 (Da)	推定の 質量 (Da)	デルタ	配列	配列番号	タンパク質
4	1110.64	1109.25	0.13%	PAASLAVHTDK	1	IEF SSP 9502
5	834.62	835.92	0.16%	FSGQIER	2	IEF SSP 9502
7	1056.57	1057.26	0.07%	RLIAEAKK	3	IEF SSP 9502
8	1187.45	1185.37	0.18%	PSLVHSRDM	4	IEF SSP 9502
10	1774.73	1766.93	0.44%	<u>VWDISTVSSVNEAFGR*</u>	5	IEF SSP 9502
10	1802.22	1805.02	0.16%	LVLGSARNSSISGPFGR	6	IEF SSP 9502
11	2746.27	2743.02	0.12%	SDKPIFTLNAHNDEISGLDLSSQIK**	7	IEF SSP 9502
12	2412.23	2409.68	0.11%	<u>VOTLOFHFFEAOTLISGSYDK*</u>	8	IEF SSP 9502
12	2475.13	2483.98	0.36%	MGVLCSSCCPDLPFTYAFGGQK	9	IEF SSP 9502

* 下線は、Edman分解によって確認された配列を示す。

**太い下線は、カルボキシペプチダーゼ消化によって確認された配列を示す。

さらに、7個の質量を、CvC-3Lのトリプシン消化に由来する4つのピークから質量分光測定によって検出した。これらの1つを直接配列決定し、そしてサイトケラチン17 (Trojanovskyら (1992) 前出; GenBank登録番号#Q04695) と同一であることを見出した。CvC-3Lトリプシンマップについて分離された画分に由来する6つの他の質量もまた、ヒトサイトケラチン17の推定のトリプシンフラグメントの質量と一致した。このタンパク質のアミノ酸配列 (Trojanovskyら (1992) (前出) による) を、配列番号18に示す。CvC-3L由来のトリプシンペプチドの質量相関データを、表5にまとめる。CvC-3Lの見かけの分子量 (47.9 kDa) は、子宮頸部の腫瘍におけるサイトケラチン17の全長分子 (推定の分子量48 kDa) の検出と一致する。

表5. CvC-3L由来のトリプシンペプチドの質量相関

ピーク	観察された 質量 (Da)	推定の 質量 (Da)	デルタ	配列	配列番号	タンパク質
4	995.46	994.03	0.14%	DYSQYYR	11	サイトケラチン 17
4	1244.97	1242.34	0.21%	NHEEEMNALR	12	サイトケラチン 17
9	1518.03	1516.67	0.09%	<u>LLEGEDAHLTQYK*</u>	13	サイトケラチン 17
10	791.19	790.94	0.03%	ILNEMR	14	サイトケラチン 17
10	835.16	832.91	0.27%	SEISELR	15	サイトケラチン 17
12	1144.21	1144.21	0.00%	DAEDWFFSK	16	サイトケラチン 17
12	1187.57	1186.33	0.10%	LSVEADINGLR	17	サイトケラチン 17

* 下線は、Edman分解によって確認した配列を示す。

CvC-5ペプチドの微量配列分析

CvC-5として同定したゲルスポットを、CvC-3の採集に使用したのと同じ調製二次元ゲル由来のHeLa核マトリックスから回収した。約100個のゲルスポットを、上記のように回収し、そして微量配列分析のためにImmunobilon-PVDFメンブレン上に再び焦点を合わせた (

refocuse)。腫瘍関連タンパク質の最初の同定の間、いくつかの子宮頸部の腫瘍において、2つのタンパク質が、CvC-5として同定された位置で互いに非常に近接して移動するようであることに注目した。一方のタンパク質のみが明らかに存在した。しかし、このタンパク質の発現を子宮頸部の腫瘍細胞株中で試験した場合、8つの細胞株の内の3つがCvC-5によって規定された領域における少なくとも2つのタンパク質の存在を示した(表3)。理論に束縛されることを要求することなく、多くの腫瘍におけるCvC-5ゲルスロット中での1つのタンパク質のみの明らかな検出の1つの説明は、タンパク質のうちの1つがより豊富であり、それによって他の近接して移動するタンパク質の存在をマスクするということである。CvC-5ゲルスロットをプールし、そして一次元ミニゲル上で再度焦点を合わせた場合、1つの拡散的に染色されたタンパク質バンドのみを検出した。

CvC-5ゲルスロットのポリペプチド成分を含む拡散バンドのトリプシンマップは、約30の溶解したピークを含んだ。質量分析をこれらのピークの12個について行い、そして30個の質量を得た。6つのアミノ酸配列を自動Edman分解によって得、これによって、3つの異なるポリペプチドの存在を明らかにした。これらの1つ目は、TPD-43またはTAR DNA結合タンパク質(Outら(1995)前出; GenBank登録番号#U23731)として既知のタンパク質である。このタンパク質の遺伝子配列から誘導される場合の完全なアミノ酸配列を、配列番号26に示す。43 kDaの見かけの分子量は、子宮頸部の腫瘍におけるインタクトなタンパク質の同定を示唆する。CvC-5トリプシンマップについて分離した画分に由来する6つの他の質量もまた、このタンパク質由来の推定のトリプシンフラグメントの質量と一致した。質量相関データ、およびTDP-43と一致するトリプシンペプチドのペプチド配列データを、表6に示す。

10

20

表6. CvC-5由来のトリプシンペプチドの質量相関

ピーク	観察された 質量 (Da)	推定の 質量 (Da)	デルタ	配列	配列番号	タンパク質
12	1729.01	1726.79	0.13%	FGGNPGGFGNQGGFGNSR	19	TDP43
13	655.72	653.78	0.30%	WCDCK	20	TDP43
13	834.24	833.89	0.04%	TTEQDLK	21	TDP43
14	682.63	681.79	0.12%	GFGFVR	22	TDP43
16	1511.88	1511.66	0.01%	LPNSKQSQDEPLR	23	TDP43
21	1280.01	1281.41	0.11%	KMDETDAASSAVK	24	TDP43
25	1342.84	1341.61	0.09%	<u>TSDLIVLGLPWK*</u>	25	TDP43

30

* 下線は、Edman分解によって確認した配列を示す。

3つのペプチドについて得られた配列情報は、核タンパク質(nucleoporin)またはNup358(Wuら(1995)前出、GenBank登録番号#L41840)として既知の核孔タンパク質と一致した。遺伝子配列から誘導される場合の完全なアミノ酸配列を、配列番号34に示す。Nup358の推定のトリプシンフラグメントと一致するCvC-5トリプシンマップから同定された5つのさらなる質量についての質量相関データを、表7に示す。Nup358と一致する配列の配置は、子宮頸部の腫瘍由来のインタクトなタンパク質(M_r 358 kDa)のC末端フラグメントの本発明者らの単離を示唆する。

40

表7. CVC-5由来のトリプシンペプチドの質量相関

ピーク	観察された 質量 (Da)	推定の 質量 (Da)	デルタ	配列	配列番号	タンパク質
9	613.14	614.66	0.25%	NY YR *	27	nup358
10	613.20	614.66	0.24%	NY YR *	28	nup358
11	702.22	701.78	0.06%	VQEAQK	29	nup358
16	938.37	939.10	0.08%	EVADCFK	30	nup358
17	2459.64	2458.54	0.04%	<u>HDGTGGQSIYGD</u> KFEDENFDVK**	31	nup358
21	1419.00	1419.71	0.05%	<u>ITMELFXNIVPR</u> **	32	nup358
21	2773.58	2771.11	0.09%	<u>HTGPGLLSMANOGONTNNXXFVIXLK</u> **	33	nup358

* 2つの隣接するHPLC画分中出现するペプチドを示す。

**下線は、Edman分解によって確認した配列を示す。

CvC-5ゲルスボット中で同定した第3のポリペプチドは、ラミンA (Fisherら (1986) 前出; GenBank登録番号#M13452) のフラグメントである。ラミンAと一致する2つの配列を、Edman分解によって得た (表8)。CvC-5トリプシンマップのフラグメントに由来する9つのさらなる質量は、ラミンA由来のトリプシンフラグメントの推定の質量と一致する。これらのさらなる質量の質量相関データを表8に示した。このタンパク質のアミノ酸配列 (Fisherら (1986) 前出) を、配列番号46に示す。

表8. CvC-5由来のトリプシンペプチドの質量相関

ピーク	観察された 質量 (Da)	推定の 質量 (Da)	デルタ	配列	配列番号	タンパク質
7	667.10	666.69	0.06%	EFESR	35	ラミン A
8	569.50	568.63	0.15%	TYSAK*	36	ラミン A
8	585.78	587.63	0.31%	LDNAR	37	ラミン A
11	569.10	568.63	0.08%	TYSAK*	38	ラミン A
11	1025.18	1023.11	0.20%	NIYSEELR	39	ラミン A
12	805.83	803.91	0.24%	TALSEKR	40	ラミン A
17	1349.52	1347.56	0.15%	<u>LALDMEIHAYR</u> **	41	ラミン A
17	1009.78	1009.18	0.06%	EMAEMRAR	42	ラミン A
21	1912.74	1913.07	0.02%	EELDFQKNYSEELR*	43	ラミン A
22	1896.58	1894.13	0.13%	<u>MOQQLDEYQELLDIK</u> **	44	ラミン A
22	1913.03	1913.07	0.00%	EELDFQKNYSEELR*	45	ラミン A

* 2つの隣接するHPLC画分中出现するペプチドを示す。

**下線は、Edman分解によって確認された配列を示す。

子宮頸ガン関連タンパク質を、上記で提供した部分的なアミノ酸配列に基づいて周知の技術を使用して同定し得る。従って、本発明の方法に従って検出される子宮頸ガン関連タンパク質は、上記の配列フラグメント中に示される連続する配列を含むとして言及され得る。上記の開示を考慮して、当業者が本明細書中に記載される方法によって同定された任意

10

20

30

40

50

の子宮頸ガン関連タンパク質に対する抗体を産生し得ることが理解される。さらに、当業者は、先の開示を考慮して、上記のフラグメントをコードする核酸配列、およびそれに相補的な核酸配列を生成し得る。さらに、当業者は、従来の組換えDNA方法論を使用して（例えば、このような核酸配列でのcDNAライブラリーのスクリーニングによって）、標的の子宮頸ガン関連タンパク質をコードする全長の核酸配列を単離し得る。このような全長の核酸配列またはそのフラグメントは、核酸に基づく検出システムまたは治療剤を生成するために使用され得る。

実施例 4

子宮頸ガン関連タンパク質に特異的に結合する抗体の産生

一旦同定されると、CvC-1からCvC-5のような子宮頸ガン関連タンパク質は、当業者に周知の多数の結合アッセイを使用して組織または体液サンプル中で検出され得る。例えば、上記のように、子宮頸ガン関連タンパク質を、子宮頸ガン関連タンパク質上に配置されたエピトープに特異的に結合する抗体（例えば、モノクローナル抗体）を使用して、組織または体液のいずれかのサンプル中で検出し得る。このような検出システムにおいて、抗体は好ましくは検出可能な部分で標識されている。

抗子宮頸ガン関連モノクローナル抗体の産生のための例示的なプロトコルを以下に提供する。他のプロトコルもまた想定される。従って、標的タンパク質に対する抗体を産生する特定の方法は、本発明の局面であるとは想定されない。

JマウスによるBalb/c (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) に、標的タンパク質（例えば、HeLa細胞核マトリックスから単離されたCvC-3タンパク質）を、免疫したマウスが適切な血清力価を獲得するまで2週間ごとに腹腔内注射する。その後、マウスに3回の連続的な静脈内追加免疫を注射する。完全フロイトアジュバント (Gibco, Grand Island) を第1回目の注射に使用し、不完全フロイトアジュバントを2回目の注射に使用する；そして生理食塩水を、続く静脈内注射に使用する。次いで動物を屠殺し、そしてその脾臓を取り出す。次いで、脾臓細胞（またはリンパ節細胞）を、マウス骨髄腫細胞株と（例えば、Kohlerら (1975) Nature 256:495 (この開示は本明細書中で参考として援用される) の方法を使用して) 融合する。次いで、標的タンパク質と反応する抗体を産生するハイブリドーマをクローニングし、そして腹水中で増殖させる。ハイブリドーマを免疫原の供給源である細胞株に対する核反応性によって、そして免疫学の分野で公知の標準的な手順を使用して組織免疫組織化学によってスクリーニングする。スクリーニングプロトコルの詳細な説明、腹水の産生、およびイムノアッセイはまた、1993年5月13日に公開されたPCT/US92/09220 (その開示は、本明細書中で参考として援用される) に開示されている。

実施例 5

個体の子宮頸ガンを検出するための抗体に基づくアッセイ

以下のアッセイは組織サンプルについて開発されているが、体液サンプルを試験するための同様のアッセイが、過度の実験を必要とすることなく開発され得ることが考慮される。代表的なアッセイは、市販の免疫検出キット（例えば、Vector Laboratories, Inc. によるABC Elite Kit）を使用し得る。

生検サンプル（例えば、パパニコラウスミア）を、適切な医学的ガイドラインに従う調査下で患者から採取する。次いで、サンプルを、ガラス製の顕微鏡スライド上に適用し、そしてサンプルを冷アセトン中で10分間固定する。次いで、スライドを蒸留水でリンスし、そして過酸化水素含有溶液（2 mLの30% H_2O_2 および30 mLの冷メタノール）で前処理する。次いで、スライドをBuffer A（0.1% Tweenおよび0.1% Brijを含むTris緩衝化生理食塩水（TBS）を含有する）でリンスする。Buffer A中のマウス抗子宮頸ガン関連タンパク質モノクローナル抗体をスライドに添加し、次いでスライドを1時間室温でインキュベートする。次いで、スライドをBuffer Aで洗浄し、そして二次抗体（ABC Elite Kit, Vector Labs, Inc）を含有するBuffer Aをスライドに添加する。次いでスライドを15分間37 °Cにて加湿チャンバー中でインキュベートする。スライドを再度Buffer Aで洗浄し、次いでシグナルの増幅のためにABC試薬（ABC Elite Kit, Vector Labs, Inc）をスライドに添加する。次いで、スライドをさらに15分間37 °Cにて加湿チャンバー中でインキュベートする。

次いで、スライドを蒸留水で洗浄し、そしてジアミノベンゼンジン（DAB）基質を4～5分間スライドに添加する。次いで、スライドを蒸留水でリンスし、ヘマトキシリンで対比染色し、95%エタノールでリンスし、100%エタノールでリンスし、次いでキシレンでリンスする。次いでカバーガラススライドにのせ、そして結果を光学顕微鏡によって観察する。

等価物

本発明は、その精神または本質的な特徴から逸脱することなく他の特定の形態に含まれる。従って、上記の実施態様は、本明細書中に記載される本発明の限定ではなく全ての局面において例示と考えられるべきである。従って、本発明の範囲は、上記の記載によってではなく添付の請求の範囲によって示され、そして請求の範囲に同等の意味および範囲内に入る全ての変更が、本発明の範囲に含まれることが意図される。

10

配列表

(1) 一般的情報：

(i) 出願人：

(A) 名称：ケーシー，スーザン

オバール，ロバート

ウー，イン - ジェ

(ii) 発明の名称：子宮頸ガンの検出のための方法および組成物

(iii) 配列数：46

(iv) 連絡住所：

20

(A) 住所：テスト，ハーヴィッツ アンド チビュルト

(B) 番地：ハイ ストリート 125

(C) 市：ボストン

(D) 州：マサチューセッツ

(E) 国：アメリカ合衆国

(F) 郵便番号：02110

(v) コンピューター読み出し形態：

(A) 媒体型：フロッピー ディスク

(B) コンピューター：IBM PC互換用

(C) OS：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース#1.0，バージョン#1.30

30

(vi) 現在の出願データ：

(A) 出願番号：

(B) 出願日：

(C) 分類：

(viii) 代理人/事務所情報：

(A) 名称：グリーンハル，ダンカン エー

(B) 登録番号：38,678

(C) 照会/記録番号：MTP-023 (8395/27)

(ix) 通信情報

40

(A) 電話：(617) 248-7000

(B) テレファックス：(617) 248-7100

(2) 配列番号1の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：11アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号1：

50

Pro Ala Ala Ser Leu Ala Val His Thr Asp Lys
 1 5 10

(2) 配列番号 2 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 7 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 2 :

10

Phe Ser Gly Gln Ile Glu Arg
 1 5

(2) 配列番号 3 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 9 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 3 :

20

Arg Leu Ile Ala Glu Ala Lys Glu Lys
 1 5

(2) 配列番号 4 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 9 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 4 :

30

Pro Ser Leu Val His Ser Arg Asp Met
 1 5

(2) 配列番号 5 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 16 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 5 :

40

Val Trp Asp Ile Ser Thr Val Ser Ser Val Asn Glu Ala Phe Gly Arg
 1 5 10 15

(2) 配列番号 6 の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 18 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号 6 :

50

Leu Val Leu Gly Ser Ala Arg Asn Ser Ser Ile Ser Gly Pro Phe Gly
 1 5 10 15

Ser Arg

(2) 配列番号7の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 25アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

10

(xi) 配列: 配列番号7:

Ser Asp Lys Pro Ile Phe Thr Leu Asn Ala His Asn Asp Glu Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Leu Asp Leu Ser Ser Gln Ile Lys
 20 25

(2) 配列番号8の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 21アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

20

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号8:

Val Gln Thr Leu Gln Phe His Pro Phe Glu Ala Gln Thr Leu Ile Ser
 1 5 10 15

Gly Ser Tyr Asp Lys
 20

(2) 配列番号9の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 23アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

30

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号9:

Met Gly Val Leu Phe Cys Ser Ser Cys Cys Pro Asp Leu Pro Phe Ile
 1 5 10 15

Tyr Ala Phe Gly Gly Gln Lys
 20

(2) 配列番号10の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 501アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

40

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号10:

Met Asn Arg Ser Arg Gln Val Thr Cys Val Ala Trp Val Arg Cys Gly
 1 5 10 15
 Val Ala Lys Glu Thr Pro Asp Lys Val Glu Leu Ser Lys Glu Glu Val
 20 25 30
 Lys Arg Leu Ile Ala Glu Ala Lys Glu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Asp Glu Glu Glu Thr Gly Ser Pro Ser Glu Asp Gly Met Gln
 50 55 60
 Ser Ala Arg Thr Gln Ala Arg Pro Arg Glu Pro Leu Glu Asp Gly Asp
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Asp Arg Thr Leu Asp Asp Asp Glu Leu Ala Glu Tyr Asp
 85 90 95
 Leu Asp Lys Tyr Asp Glu Glu Gly Asp Pro Asp Ala Glu Thr Leu Gly
 100 105 110
 Glu Ser Leu Leu Gly Leu Thr Val Tyr Gly Ser Asn Asp Gln Asp Pro
 115 120 125
 Tyr Val Thr Leu Lys Asp Thr Glu Gln Tyr Glu Arg Glu Asp Phe Leu
 130 135 140
 Ile Lys Pro Ser Asp Asn Leu Ile Val Cys Gly Arg Ala Glu Gln Asp
 145 150 155 160
 Gln Cys Asn Leu Glu Val His Val Tyr Asn Gln Glu Glu Asp Ser Phe
 165 170 175
 Tyr Val His His Asp Ile Leu Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Ser Val Glu
 180 185 190
 Trp Leu Asn Phe Asp Pro Ser Pro Asp Asp Ser Thr Gly Asn Tyr Ile
 195 200 205
 Ala Val Gly Asn Met Thr Pro Val Ile Glu Val Trp Asp Leu Asp Ile
 210 215 220
 Val Asp Ser Leu Glu Pro Val Phe Thr Leu Gly Ser Lys Leu Ser Lys
 225 230 235 240
 Lys Lys Lys Lys Lys Gly Lys Lys Ser Ser Ser Ala Glu Gly His Thr
 245 250 255
 Asp Ala Val Leu Asp Leu Ser Trp Asn Lys Leu Ile Arg Asn Val Leu
 260 265 270
 Ala Ser Ala Ser Ala Asp Asn Thr Val Ile Leu Trp Asp Met Ser Leu
 275 280 285
 Gly Lys Pro Ala Ala Ser Leu Ala Val His Thr Asp Lys Val Gln Thr
 290 295 300
 Leu Gln Phe His Pro Phe Glu Ala Gln Thr Leu Ile Ser Gly Ser Tyr
 305 310 315 320
 Asp Lys Ser Val Ala Leu Tyr Asp Cys Arg Ser Pro Asp Glu Ser His
 325 330 335
 Arg Met Trp Arg Phe Ser Gly Gln Ile Glu Arg Val Thr Trp Asn His
 340 345 350
 Phe Ser Pro Cys His Phe Leu Ala Ser Thr Asp Asp Gly Phe Val Tyr
 355 360 365
 Asn Leu Asp Ala Arg Ser Asp Lys Pro Ile Phe Thr Leu Asn Ala His
 370 375 380
 Asn Asp Glu Ile Ser Gly Leu Asp Leu Ser Ser Gln Ile Lys Gly Cys
 385 390 395 400
 Leu Val Thr Ala Ser Ala Asp Lys Tyr Val Lys Ile Trp Asp Ile Leu
 405 410 415
 Gly Asp Arg Pro Ser Leu Val His Ser Arg Asp Met Lys Met Gly Val
 420 425 430
 Leu Phe Cys Ser Ser Cys Cys Pro Asp Leu Pro Phe Ile Tyr Ala Phe
 435 440 445
 Gly Gly Gln Lys Glu Gly Leu Arg Val Trp Asp Ile Ser Thr Val Ser
 450 455 460

10

20

30

40

Ser Val Asn Glu Ala Phe Gly Arg Arg Glu Arg Leu Val Leu Gly Ser
 465 470 475 480
 Ala Arg Asn Ser Ser Ile Ser Gly Pro Phe Gly Ser Arg Ser Ser Asp
 485 490 495
 Thr Pro Met Glu Ser
 500

(2) 配列番号11の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 7 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

10

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号11:

Asp Tyr Ser Gln Tyr Tyr Arg
 1 5

(2) 配列番号12の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 10 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

20

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号12:

Asn His Glu Glu Glu Met Asn Ala Leu Arg
 1 5 10

(2) 配列番号13の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 13 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

30

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号13:

Leu Leu Glu Gly Glu Asp Ala His Leu Thr Gln Tyr Lys
 1 5 10

(2) 配列番号14の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 6 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

40

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号14:

Ile Leu Asn Glu Met Arg
 1 5

(2) 配列番号15の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 7 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

50

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号15：

Ser Glu Ile Ser Glu Leu Arg
1 5

(2) 配列番号16の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：9 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

10

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号16：

Asp Ala Glu Asp Trp Phe Phe Ser Lys
1 5

(2) 配列番号17の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：11 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

20

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号17：

Leu Ser Val Glu Ala Asp Ile Asn Gly Leu Arg
1 5 10

(2) 配列番号18の情報：

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：432 アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

30

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号18：

Met Thr Thr Ser Ile Arg Gln Phe Thr Ser Ser Ser Ser Ile Lys Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Gly Leu Gly Gly Gly Ser Ser Arg Thr Ser Cys Arg Leu Ser
 20 25 30
 Gly Gly Leu Gly Ala Gly Ser Cys Arg Leu Gly Ser Ala Gly Gly Leu
 35 40 45
 Gly Ser Thr Leu Gly Gly Ser Ser Tyr Ser Ser Cys Tyr Ser Phe Gly
 50 55 60
 Ser Gly Gly Gly Tyr Gly Ser Ser Phe Gly Gly Val Asp Gly Leu Leu
 65 70 75 80
 Ala Gly Gly Glu Lys Ala Thr Met Gln Asn Leu Asn Asp Arg Leu Ala
 85 90 95
 Ser Tyr Leu Asp Lys Val Arg Ala Leu Glu Glu Ala Asn Thr Glu Leu
 100 105 110
 Glu Val Lys Ile Arg Asp Trp Tyr Gln Arg Gln Ala Pro Gly Pro Ala
 115 120 125
 Arg Asp Tyr Ser Gln Tyr Tyr Arg Thr Ile Glu Glu Leu Gln Asn Lys
 130 135 140
 Ile Leu Thr Ala Thr Val Asp Asn Ala Asn Ile Leu Leu Gln Ile Asp
 145 150 155 160
 Asn Ala Arg Leu Ala Ala Asp Asp Phe Arg Thr Lys Phe Glu Thr Glu
 165 170 175
 Gln Ala Leu Arg Leu Ser Val Glu Ala Asp Ile Asn Gly Leu Arg Arg
 180 185 190
 Val Leu Asp Glu Leu Thr Leu Ala Arg Ala Asp Leu Glu Met Gln Ile
 195 200 205
 Glu Asn Leu Lys Glu Glu Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Asn His Glu Glu
 210 215 220
 Glu Met Asn Ala Leu Arg Gly Gln Val Gly Gly Glu Ile Asn Val Glu
 225 230 235 240
 Met Asp Ala Ala Pro Gly Val Asp Leu Ser Arg Ile Leu Asn Glu Met
 245 250 255
 Arg Asp Gln Tyr Glu Lys Met Ala Glu Lys Asn Arg Lys Asp Ala Glu
 260 265 270
 Asp Trp Phe Phe Ser Lys Thr Glu Glu Leu Asn Arg Glu Val Ala Thr
 275 280 285
 Asn Ser Glu Leu Val Gln Ser Gly Lys Ser Glu Ile Ser Glu Leu Arg
 290 295 300
 Arg Thr Met Gln Ala Leu Glu Ile Glu Leu Gln Ser Gln Leu Ser Met
 305 310 315 320
 Lys Ala Ser Leu Glu Gly Asn Leu Ala Glu Thr Glu Asn Arg Tyr Cys
 325 330 335
 Val Gln Leu Ser Gln Ile Gln Gly Leu Ile Gly Ser Val Glu Glu Gln
 340 345 350
 Leu Ala Gln Leu Arg Cys Glu Met Glu Gln Gln Asn Gln Glu Tyr Lys
 355 360 365
 Ile Leu Leu Asp Val Lys Thr Arg Leu Glu Gln Glu Ile Ala Thr Tyr
 370 375 380
 Arg Arg Leu Leu Glu Gly Glu Asp Ala His Leu Thr Gln Tyr Lys Lys
 385 390 395 400
 Glu Pro Val Thr Thr Arg Gln Val Arg Thr Ile Val Glu Glu Val Gln
 405 410 415
 Asp Gly Lys Val Ile Ser Ser Arg Glu Gln Val His Gln Thr Thr Arg
 420 425 430

10

20

30

40

(2) 配列番号19の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 18アミノ酸

50

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号19 :

Phe Gly Gly Asn Pro Gly Gly Phe Gly Asn Gln Gly Gly Phe Gly Asn
1 5 10 15

Ser Arg

(2) 配列番号20の情報 :

(i) 配列の特徴 :

10

(A) 長さ : 5 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号20 :

Trp Cys Asp Cys Lys
1 5

(2) 配列番号21の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 7 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号21 :

Thr Thr Glu Gln Asp Leu Lys
1 5

(2) 配列番号22の情報 :

(i) 配列の特徴 :

30

(A) 長さ : 6 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号22 :

Gly Phe Gly Phe Val Arg
1 5

(2) 配列番号23の情報 :

(i) 配列の特徴 :

40

(A) 長さ : 13 アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号23 :

Leu Pro Asn Ser Lys Gln Ser Gln Asp Glu Pro Leu Arg
1 5 10

(2) 配列番号24の情報 :

(i) 配列の特徴 :

50

- (A) 長さ：12アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎖の数：
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (xi) 配列：配列番号24：

Lys Met Asp Glu Thr Asp Ala Ser Ser Ala Val Lys
 1 5 10

- (2) 配列番号25の情報：

- (i) 配列の特徴：

10

- (A) 長さ：12アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎖の数：
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (xi) 配列：配列番号25：

Thr Ser Asp Leu Ile Val Leu Gly Leu Pro Trp Lys
 1 5 10

- (2) 配列番号26の情報：

- (i) 配列の特徴：

20

- (A) 長さ：414アミノ酸
- (B) 型：アミノ酸
- (C) 鎖の数：
- (D) トポロジー：直鎖状
- (ii) 配列の種類：ペプチド
- (xi) 配列：配列番号26：

Met Ser Glu Tyr Ile Arg Val Thr Glu Asp Glu Asn Asp Glu Pro Ile
 1 5 10 15
 Glu Ile Pro Ser Glu Asp Asp Gly Thr Val Leu Leu Ser Thr Val Thr
 20 25 30
 Ala Gln Phe Pro Gly Ala Cys Gly Leu Arg Tyr Arg Asn Pro Val Ser
 35 40 45
 Gln Cys Met Arg Gly Val Arg Leu Val Glu Gly Ile Leu His Ala Pro
 50 55 60
 Asp Ala Gly Trp Gly Asn Leu Val Tyr Val Val Asn Tyr Pro Lys Asp
 65 70 75 80
 Asn Lys Arg Lys Met Asp Glu Thr Asp Ala Ser Ser Ala Val Lys Val
 85 90 95
 Lys Arg Ala Val Gln Lys Thr Ser Asp Leu Ile Val Leu Gly Leu Pro
 100 105 110
 Trp Lys Thr Thr Glu Gln Asp Leu Lys Glu Tyr Phe Ser Thr Phe Gly
 115 120 125
 Glu Val Leu Met Val Gln Val Lys Lys Asp Leu Lys Thr Gly His Ser
 130 135 140
 Lys Gly Phe Gly Phe Val Arg Phe Thr Glu Tyr Glu Thr Gln Val Lys
 145 150 155 160
 Val Met Ser Gln Arg His Met Ile Asp Gly Arg Trp Cys Asp Cys Lys
 165 170 175
 Leu Pro Asn Ser Lys Gln Ser Gln Asp Glu Pro Leu Arg Ser Arg Lys
 180 185 190
 Val Phe Val Gly Arg Cys Thr Glu Asp Met Thr Glu Asp Glu Leu Arg
 195 200 205
 Glu Phe Phe Ser Gln Tyr Gly Asp Val Met Asp Val Phe Ile Pro Lys
 210 215 220
 Pro Phe Arg Ala Phe Ala Phe Val Thr Phe Ala Asp Asp Gln Ile Ala
 225 230 235 240
 Gln Ser Leu Cys Gly Glu Asp Leu Ile Ile Lys Gly Ile Ser Val His
 245 250 255
 Ile Ser Asn Ala Glu Pro Lys His Asn Ser Asn Arg Gln Leu Glu Arg
 260 265 270
 Ser Gly Arg Phe Gly Gly Asn Pro Gly Gly Phe Gly Asn Gln Gly Gly
 275 280 285
 Phe Gly Asn Ser Arg Gly Gly Gly Ala Gly Leu Gly Asn Asn Gln Gly
 290 295 300
 Ser Asn Met Gly Gly Gly Met Asn Phe Gly Ala Phe Ser Ile Asn Pro
 305 310 315 320
 Ala Met Met Ala Ala Ala Gln Ala Ala Leu Gln Ser Ser Trp Gly Met
 325 330 335
 Met Gly Met Leu Ala Ser Gln Gln Asn Gln Ser Gly Pro Ser Gly Asn
 340 345 350
 Asn Gln Asn Gln Gly Asn Met Gln Arg Glu Pro Asn Gln Ala Phe Gly
 355 360 365
 Ser Gly Asn Asn Ser Tyr Ser Gly Ser Asn Ser Gly Ala Ala Ile Gly
 370 375 380
 Trp Gly Ser Ala Ser Asn Ala Gly Ser Gly Ser Gly Phe Asn Gly Gly
 385 390 395 400
 Phe Gly Ser Ser Met Asp Ser Lys Ser Ser Gly Trp Gly Met
 405 410

10

20

30

40

(2) 配列番号27の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 4 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

50

(D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号27：
Asn Tyr Tyr Arg
 1

(2) 配列番号28の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：4 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号28：
Asn Tyr Tyr Arg
 1

10

(2) 配列番号29の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：6 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号29：
Val Gln Glu Ala Gln Lys
 1 5

20

(2) 配列番号30の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：7 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号30：
Glu Val Ala Asp Cys Phe Lys
 1 5

30

(2) 配列番号31の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：22アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号31：
His Asp Gly Thr Gly Gly Gln Ser Ile Tyr Gly Asp Lys Phe Glu Asp
 1 5 10 15
Glu Asn Phe Asp Val Lys
 20

40

(2) 配列番号32の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：12アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸

50

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号32 :

Ile Thr Met Glu Leu Phe Xaa Asn Ile Val Pro Arg
1 5 10

(2) 配列番号33の情報 :

(i) 配列の特徴 :

(A) 長さ : 26アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

10

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号33 :

His Thr Gly Pro Gly Leu Leu Ser Met Ala Asn Gln Gly Gln Asn Thr
1 5 10 15
Asn Asn Xaa Xaa Phe Val Ile Xaa Leu Lys
20 25

(2) 配列番号34の情報 :

(i) 配列の特徴 :

20

(A) 長さ : 3224アミノ酸

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号34 :

Met Arg Arg Ser Lys Ala Asp Val Glu Arg Tyr Ile Ala Ser Val Gln
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Pro Ser Pro Arg Gln Lys Ser Met Lys Gly Phe Tyr Phe
 20 25 30
 Ala Lys Leu Tyr Tyr Glu Ala Lys Glu Tyr Asp Leu Ala Lys Lys Tyr
 35 40 45
 Ile Cys Thr Tyr Ile Asn Val Gln Glu Arg Asp Pro Lys Ala His Arg
 50 55 60
 Phe Leu Gly Leu Leu Tyr Glu Leu Glu Glu Asn Thr Asp Lys Ala Val
 65 70 75 80
 Glu Cys Tyr Arg Arg Ser Val Glu Leu Asn Pro Thr Gln Lys Asp Leu
 85 90 95
 Val Leu Lys Ile Ala Glu Leu Leu Cys Lys Asn Asp Val Thr Asp Gly
 100 105 110
 Arg Ala Lys Tyr Trp Leu Glu Arg Ala Ala Lys Leu Phe Pro Gly Ser
 115 120 125
 Pro Ala Ile Tyr Lys Leu Lys Glu Gln Leu Leu Asp Cys Glu Gly Glu
 130 135 140
 Asp Gly Trp Asn Lys Leu Phe Asp Leu Ile Gln Ser Glu Leu Tyr Val
 145 150 155 160
 Arg Pro Asp Asp Val His Val Asn Ile Arg Leu Val Glu Val Tyr Arg
 165 170 175
 Ser Thr Lys Arg Leu Lys Asp Ala Val Ala His Cys His Glu Ala Glu
 180 185 190
 Arg Asn Ile Ala Leu Arg Ser Ser Leu Glu Trp Asn Ser Cys Val Val
 195 200 205
 Gln Thr Leu Lys Glu Tyr Leu Glu Ser Leu Gln Cys Leu Glu Ser Asp
 210 215 220
 Lys Ser Asp Trp Arg Ala Thr Asn Thr Asp Leu Leu Leu Ala Tyr Ala
 225 230 235 240
 Asn Leu Met Leu Leu Thr Leu Ser Thr Arg Asp Val Gln Glu Ser Arg
 245 250 255
 Glu Leu Leu Gln Ser Phe Asp Ser Ala Leu Gln Ser Val Lys Ser Leu
 260 265 270
 Gly Gly Asn Asp Glu Leu Ser Ala Thr Phe Leu Glu Met Lys Gly His
 275 280 285
 Phe Tyr Met His Ala Gly Ser Leu Leu Leu Lys Met Gly Gln His Ser
 290 295 300
 Ser Asn Val Gln Trp Arg Ala Leu Ser Glu Leu Ala Ala Leu Cys Tyr
 305 310 315 320
 Leu Ile Ala Phe Gln Val Pro Arg Pro Lys Ile Lys Leu Ile Lys Gly
 325 330 335
 Glu Ala Gly Gln Asn Leu Leu Glu Met Met Ala Cys Asp Arg Leu Ser
 340 345 350
 Gln Ser Gly His Met Leu Leu Asn Leu Ser Arg Gly Lys Gln Asp Phe
 355 360 365
 Leu Lys Glu Ile Val Glu Thr Phe Ala Asn Lys Ser Gly Gln Ser Ala
 370 375 380
 Leu Tyr Asp Ala Leu Phe Ser Ser Gln Ser Pro Lys Asp Thr Ser Phe
 385 390 395 400
 Leu Gly Ser Asp Asp Ile Gly Asn Ile Asp Val Arg Glu Pro Glu Leu
 405 410 415

10

20

30

40

Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Asp Val Gly Ala Ile Arg Ala His Asn Gly
 420 425 430
 Ser Leu Gln His Leu Thr Trp Leu Gly Leu Gln Trp Asn Ser Leu Pro
 435 440 445
 Ala Leu Pro Gly Ile Arg Lys Trp Leu Lys Gln Leu Phe His His Leu
 450 455 460
 Pro His Glu Thr Ser Arg Leu Glu Thr Asn Ala Pro Glu Ser Ile Cys
 465 470 475 480
 Ile Leu Asp Leu Glu Val Phe Leu Leu Gly Val Val Tyr Thr Ser His
 485 490 495
 Leu Gln Leu Lys Glu Lys Cys Asn Ser His His Ser Ser Tyr Gln Pro
 500 505 510
 Leu Cys Leu Pro Leu Pro Val Cys Lys Gln Leu Cys Thr Glu Arg Gln
 515 520 525
 Lys Ser Trp Trp Asp Ala Val Cys Thr Leu Ile His Arg Lys Ala Val
 530 535 540
 Pro Gly Asn Val Ala Lys Leu Arg Leu Leu Val Gln His Glu Ile Asn
 545 550 555 560
 Thr Leu Arg Ala Gln Glu Lys His Gly Leu Gln Pro Ala Leu Leu Val
 565 570 575
 His Trp Ala Glu Cys Leu Gln Lys Thr Gly Ser Gly Leu Asn Ser Phe
 580 585 590
 Tyr Asp Gln Arg Glu Tyr Ile Gly Arg Ser Val His Tyr Trp Lys Lys
 595 600 605
 Val Leu Pro Leu Leu Lys Ile Ile Lys Lys Lys Asn Ser Ile Pro Glu
 610 615 620
 Pro Ile Asp Pro Leu Phe Lys His Phe His Ser Val Asp Ile Gln Ala
 625 630 635 640
 Ser Glu Ile Val Glu Tyr Glu Glu Asp Ala His Ile Thr Phe Ala Ile
 645 650 655
 Leu Asp Ala Val Asn Gly Asn Ile Glu Asp Ala Val Thr Ala Phe Glu
 660 665 670
 Ser Ile Lys Ser Val Val Ser Tyr Trp Asn Leu Ala Leu Ile Phe His
 675 680 685
 Arg Lys Ala Glu Asp Ile Glu Asn Asp Ala Leu Ser Pro Glu Glu Gln
 690 695 700
 Glu Glu Cys Lys Asn Tyr Leu Arg Lys Thr Arg Asp Tyr Leu Ile Lys
 705 710 715 720
 Ile Ile Asp Asp Ser Asp Ser Asn Leu Ser Val Val Lys Lys Leu Pro
 725 730 735
 Val Pro Leu Glu Ser Val Lys Glu Met Leu Asn Ser Val Met Gln Glu
 740 745 750
 Leu Glu Asp Tyr Ser Glu Gly Gly Pro Leu Tyr Lys Asn Gly Ser Leu
 755 760 765
 Arg Asn Ala Asp Ser Glu Ile Lys Arg Ser Thr Pro Ser Pro Thr Arg
 770 775 780
 Tyr Ser Leu Ser Pro Ser Lys Ser Tyr Lys Tyr Ser Pro Lys Thr Pro
 785 790 795 800
 Pro Arg Trp Ala Glu Asp Gln Asn Ser Leu Leu Lys Met Ile Cys Gln
 805 810 815
 Gln Val Glu Ala Ile Lys Lys Glu Met Gln Glu Leu Lys Leu Asn Ser

10

20

30

40

820	825	830
Ser Asn Ser 835	Ala Ser Pro His Arg Trp Pro Thr Glu Asn Tyr Gly Pro 840	845
Asp Ser Val 850	Pro Asp Gly Tyr Gln Gly Ser Gln Thr Phe His Gly Ala 855	860
Pro Leu Thr Val 865	Ala Thr Thr Gly Pro Ser Val Tyr Tyr Ser Gln Ser 870	875
Pro Ala Tyr Asn 885	Ser Gln Tyr Leu Leu Arg Pro Ala Ala Asn Val Thr 890	895
Pro Thr Lys 900	Gly Pro Val Tyr Gly Met Asn Arg Leu Pro Pro Gln Gln 905	910
His Ile Tyr 915	Ala Tyr Pro Gln Gln Met His Thr Pro Pro Val Gln Ser 920	925
Ser Ser Ala Cys Met Phe 930	Ser 935 Gln Glu Met Tyr Gly Pro Pro Ala Leu 940	
Arg Phe Glu Ser Pro 945	Ala Thr Gly Ile Leu Ser 950	955
Tyr Phe Asn Tyr 965	Asn Val Gln Gln Thr Ser Thr Asn Pro Pro Leu Pro 970	975
Glu Pro Gly Tyr 980	Phe Thr Lys Pro Pro Ile Ala Ala His Ala Ser Arg 985	990
Ser Ala Glu Ser Lys Thr 995	Ile Glu Phe Gly Lys Thr Asn Phe Val Gln 1000	1005
Pro Met Pro Gly Glu Gly 1010	Leu Arg Pro Ser Leu Pro Thr Gln Ala His 1015	1020
Thr Thr Gln Pro Thr 1025	Pro Phe Lys Phe Asn Ser Asn Phe Lys Ser Asn 1030	1035
Asp Gly Asp Phe 1045	Thr Phe Ser Ser Pro Gln Val Val Thr Gln Pro Pro 1050	1055
Pro Ala Ala Tyr 1060	Ser Asn Ser Glu Ser Leu Leu Gly Leu Leu Thr Ser 1065	1070
Asp Lys Pro Leu Gln Gly Asp 1075	Gly Tyr Ser Gly Ala Lys Pro Ile Pro 1080	1085
Gly Gly Gln Thr 1090	Ile Gly Pro Arg Asn Thr Phe Asn Phe Gly Ser Lys 1095	1100
Asn Val Ser Gly Ile 1105	Ser Phe Thr Glu Asn Met Gly Ser Ser Gln Gln 1110	1115
Lys Asn Ser Gly 1125	Phe Arg Arg Ser Asp Asp Met Phe Thr Phe His Gly 1130	1135
Pro Gly Lys Ser Val Phe Gly 1140	Thr Pro Thr Leu Glu Thr Ala Asn Lys 1145	1150
Asn His Glu Thr Asp Gly Gly 1155	Ser Ala His Gly Asp Asp Asp Asp 1160	1165
Gly Pro His Phe Glu Pro 1170	Val Val Pro Leu Pro Asp Lys Ile Glu Val 1175	1180
Lys Thr Gly Glu Glu 1185	Asp Glu Glu Glu Phe Phe Cys Asn Arg Ala Lys 1190	1195
Leu Phe Arg Phe Asp Val Glu Ser Lys 1205	Glu Trp Lys Glu Arg Gly Ile 1210	1215
Gly Asn Val Lys Ile Leu Arg His 1220	Lys Thr Ser Gly Lys Ile Arg Leu 1225	1230
Leu Met Arg Arg Glu Gln Val Leu Lys Ile Cys Ala Asn His Tyr Ile		

10

20

30

40

1235	1240	1245
Ser Pro Asp Met Lys Leu Thr Pro Asn Ala Gly Ser Asp Arg Ser Phe 1250 1255 1260		
Val Trp His Ala Leu Asp Tyr Ala Asp Glu Leu Pro Lys Pro Glu Gln 1265 1270 1275 1280		
Leu Ala Ile Arg Phe Lys Thr Pro Glu Glu Ala Ala Leu Phe Lys Cys 1285 1290 1295		
Lys Phe Glu Glu Ala Gln Ser Ile Leu Lys Ala Pro Gly Thr Asn Val 1300 1305 1310		
Ala Met Ala Ser Asn Gln Ala Val Arg Ile Val Lys Glu Pro Thr Ser 1315 1320 1325		
His Asp Asn Lys Asp Ile Cys Lys Ser Asp Ala Gly Asn Leu Asn Phe 1330 1335 1340		
Glu Phe Gln Val Ala Lys Lys Glu Gly Ser Trp Trp His Cys Asn Ser 1345 1350 1355 1360		
Cys Ser Leu Lys Asn Ala Ser Thr Ala Lys Lys Cys Val Ser Cys Gln 1365 1370 1375		
Asn Leu Asn Pro Ser Asn Lys Glu Leu Val Gly Pro Pro Leu Ala Glu 1380 1385 1390		
Thr Val Phe Thr Pro Lys Thr Ser Pro Glu Asn Val Gln Asp Arg Phe 1395 1400 1405		
Ala Leu Val Thr Pro Lys Lys Glu Gly His Trp Asp Cys Ser Ile Cys 1410 1415 1420		
Leu Val Arg Asn Glu Pro Thr Val Ser Arg Cys Ile Ala Cys Gln Asn 1425 1430 1435 1440		
Thr Lys Ser Ala Asn Lys Ser Gly Ser Ser Phe Val His Gln Ala Ser 1445 1450 1455		
Phe Lys Phe Gly Gln Gly Asp Leu Pro Lys Pro Ile Asn Ser Asp Phe 1460 1465 1470		
Arg Ser Val Phe Ser Thr Lys Glu Gly Gln Trp Asp Cys Ser Ala Cys 1475 1480 1485		
Leu Val Gln Asn Glu Gly Ser Ser Thr Lys Cys Ala Ala Cys Gln Asn 1490 1495 1500		
Pro Arg Lys Gln Ser Leu Pro Ala Thr Ser Ile Pro Thr Pro Ala Ser 1505 1510 1515 1520		
Phe Lys Phe Gly Thr Ser Glu Thr Ser Lys Thr Leu Lys Ser Gly Phe 1525 1530 1535		
Glu Asp Met Phe Ala Lys Lys Glu Gly Gln Trp Asp Cys Ser Ser Cys 1540 1545 1550		
Leu Val Arg Asn Glu Ala Asn Ala Thr Arg Cys Val Ala Cys Gln Asn 1555 1560 1565		
Pro Asp Lys Pro Ser Pro Ser Thr Ser Val Pro Ala Pro Ala Ser Phe 1570 1575 1580		
Lys Phe Gly Thr Ser Glu Thr Ser Lys Ala Pro Lys Ser Gly Phe Glu 1585 1590 1595 1600		
Gly Met Phe Thr Lys Lys Glu Gly Gln Trp Asp Cys Ser Val Cys Leu 1605 1610 1615		
Val Arg Asn Glu Ala Ser Ala Thr Lys Cys Ile Ala Cys Gln Asn Pro 1620 1625 1630		
Gly Lys Gln Asn Gln Thr Thr Ser Ala Val Ser Thr Pro Ala Ser Ser 1635 1640 1645		

10

20

30

40

Glu Thr Ser Lys Ala Pro Lys Ser Gly Phe Glu Gly Met Phe Thr Lys
 1650 1655 1660
 Lys Glu Gly Gln Trp Asp Cys Ser Val Cys Leu Val Arg Asn Glu Ala
 1665 1670 1675 1680
 Ser Ala Thr Lys Cys Ile Ala Cys Gln Asn Pro Gly Lys Gln Asn Gln
 1685 1690 1695
 Thr Thr Ser Ala Val Ser Thr Pro Ala Ser Ser Glu Thr Ser Lys Ala
 1700 1705 1710
 Pro Lys Ser Gly Phe Glu Gly Met Phe Thr Lys Lys Glu Gly Gln Trp
 1715 1720 1725
 Asp Cys Ser Val Cys Leu Val Arg Asn Glu Ala Ser Ala Thr Lys Cys
 1730 1735 1740
 Ile Ala Cys Gln Cys Pro Ser Lys Gln Asn Gln Thr Thr Ala Ile Ser
 1745 1750 1755 1760
 Thr Pro Ala Ser Ser Glu Ile Ser Lys Ala Pro Lys Ser Gly Phe Glu
 1765 1770 1775
 Gly Met Phe Ile Arg Lys Gly Gln Trp Asp Cys Ser Val Cys Cys Val
 1780 1785 1790
 Gln Asn Glu Ser Ser Ser Leu Lys Cys Val Ala Cys Asp Ala Ser Lys
 1795 1800 1805
 Pro Thr His Lys Pro Ile Ala Glu Ala Pro Ser Ala Phe Thr Leu Gly
 1810 1815 1820
 Ser Glu Met Lys Leu His Asp Ser Ser Gly Ser Gln Val Gly Thr Gly
 1825 1830 1835 1840
 Phe Lys Ser Asn Phe Ser Glu Lys Ala Ser Lys Phe Gly Asn Thr Glu
 1845 1850 1855
 Gln Gly Phe Lys Phe Gly His Val Asp Gln Glu Asn Ser Pro Ser Phe
 1860 1865 1870
 Met Phe Gln Gly Ser Ser Asn Thr Glu Phe Lys Ser Thr Lys Glu Gly
 1875 1880 1885
 Phe Ser Ile Pro Val Ser Ala Asp Gly Phe Lys Phe Gly Ile Ser Glu
 1890 1895 1900
 Pro Gly Asn Gln Glu Lys Lys Ser Glu Lys Pro Leu Glu Asn Gly Thr
 1905 1910 1915 1920
 Gly Phe Gln Ala Gln Asp Ile Ser Gly Gln Lys Asn Gly Arg Gly Val
 1925 1930 1935
 Ile Phe Gly Gln Thr Ser Ser Thr Phe Thr Phe Ala Asp Leu Ala Lys
 1940 1945 1950
 Ser Thr Ser Gly Glu Gly Phe Gln Phe Gly Lys Lys Asp Pro Asn Phe
 1955 1960 1965
 Lys Gly Phe Ser Gly Ala Gly Glu Lys Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Gly
 1970 1975 1980
 Lys Met Ala Asn Lys Ala Asn Thr Ser Gly Asp Phe Glu Lys Asp Asp
 1985 1990 1995 2000
 Asp Ala Tyr Lys Thr Glu Asp Ser Asp Asp Ile His Phe Glu Pro Val
 2005 2010 2015
 Val Gln Met Pro Glu Lys Val Glu Leu Val Thr Gly Glu Glu Asp Glu
 2020 2025 2030
 Lys Val Leu Tyr Ser Gln Arg Val Lys Leu Phe Arg Phe Asp Ala Glu
 2035 2040 2045
 Val Ser Gln Trp Lys Glu Arg Gly Leu Gly Asn Leu Lys Ile Leu Lys
 2050 2055 2060

Asn Glu Val Asn Gly Lys Leu Arg Met Leu Met Arg Arg Glu Gln Val
 2065 2070 2075 2080
 Leu Lys Val Cys Ala Asn His Trp Ile Thr Thr Thr Met Asn Leu Lys
 2085 2090 2095
 Pro Leu Ser Gly Ser Asp Arg Ala Trp Met Trp Leu Ala Ser Asp Phe
 2100 2105 2110
 Ser Asp Gly Asp Ala Lys Leu Glu Gln Leu Ala Ala Lys Phe Lys Thr
 2115 2120 2125
 Pro Glu Leu Ala Glu Glu Phe Lys Gln Lys Phe Glu Glu Cys Gln Arg
 2130 2135 2140
 Leu Leu Leu Asp Ile Pro Leu Gln Thr Pro His Lys Leu Val Asp Thr
 2145 2150 2155 2160
 Gly Arg Ala Ala Lys Leu Ile Gln Arg Ala Glu Glu Met Lys Ser Gly
 2165 2170 2175
 Leu Lys Asp Phe Lys Thr Phe Leu Thr Asn Asp Gln Thr Lys Val Thr
 2180 2185 2190
 Glu Glu Glu Asn Lys Gly Ser Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ser Asp
 2195 2200 2205
 Thr Thr Ile Lys Pro Asn Pro Glu Asn Thr Gly Pro Thr Leu Glu Trp
 2210 2215 2220
 Asp Asn Tyr Asp Leu Arg Glu Asp Ala Leu Asp Asp Ser Val Ser Ser
 2225 2230 2235 2240
 Ser Ser Val His Ala Ser Pro Leu Ala Ser Ser Pro Val Arg Lys Asn
 2245 2250 2255
 Leu Phe Arg Phe Gly Glu Ser Thr Thr Gly Phe Asn Phe Ser Phe Lys
 2260 2265 2270
 Ser Ala Leu Ser Pro Ser Lys Ser Pro Ala Lys Leu Asn Gln Ser Gly
 2275 2280 2285
 Thr Ser Val Gly Thr Asp Glu Glu Ser Asp Val Thr Gln Glu Glu Glu
 2290 2295 2300
 Arg Asp Gly Gln Tyr Phe Glu Pro Val Val Pro Leu Pro Asp Leu Val
 2305 2310 2315 2320
 Glu Val Ser Ser Gly Glu Glu Asn Glu Gln Val Val Phe Ser His Arg
 2325 2330 2335
 Ala Lys Leu Tyr Arg Tyr Asp Lys Asp Val Gly Gln Trp Lys Glu Arg
 2340 2345 2350
 Gly Ile Gly Asp Ile Lys Ile Leu Gln Asn Tyr Asp Asn Lys Gln Val
 2355 2360 2365
 Arg Ile Val Met Arg Arg Asp Gln Val Leu Lys Leu Cys Ala Asn His
 2370 2375 2380
 Arg Ile Thr Pro Asp Met Thr Leu Gln Asn Met Lys Gly Thr Glu Arg
 2385 2390 2395 2400
 Val Trp Leu Trp Thr Ala Cys Asp Phe Ala Asp Gly Glu Arg Lys Val
 2405 2410 2415
 Glu His Leu Ala Val Arg Phe Lys Leu Gln Asp Val Ala Asp Ser Phe
 2420 2425 2430
 Lys Lys Ile Phe Asp Glu Ala Lys Thr Ala Gln Glu Lys Asp Ser Leu
 2435 2440 2445
 Ile Thr Pro His Val Ser Arg Ser Ser Thr Pro Arg Glu Ser Pro Cys
 2450 2455 2460
 Gly Lys Ile Ala Val Ala Val Leu Glu Glu Thr Thr Arg Glu Arg Thr
 2465 2470 2475 2480

10

20

30

40

Asp Val Ile Gln Gly Asp Asp Val Ala Asp Ala Thr Ser Glu Val Glu
 2485 2490 2495
 Val Ser Ser Thr Ser Glu Thr Thr Pro Lys Ala Val Val Ser Pro Pro
 2500 2505 2510
 Lys Phe Val Phe Gly Ser Glu Ser Val Lys Ser Ile Phe Ser Ser Glu
 2515 2520 2525
 Lys Ser Lys Pro Phe Ala Phe Gly Asn Ser Ser Ala Thr Gly Ser Leu
 2530 2535 2540
 Phe Gly Phe Ser Phe Asn Ala Pro Leu Lys Ser Asn Asn Ser Glu Thr
 2545 2550 2555 2560
 Ser Ser Val Ala Gln Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Glu Pro Lys Lys
 2565 2570 2575
 Cys Glu Leu Ser Lys Asn Ser Asp Ile Glu Gln Ser Ser Asp Ser Lys
 2580 2585 2590
 Val Lys Asn Leu Phe Ala Ser Phe Pro Thr Glu Glu Ser Ser Ile Asn
 2595 2600 2605
 Tyr Thr Phe Lys Thr Pro Glu Lys Ala Lys Glu Lys Lys Lys Pro Glu
 2610 2615 2620
 Asp Ser Pro Ser Asp Asp Asp Val Leu Ile Val Tyr Glu Leu Thr Pro
 2625 2630 2635 2640
 Thr Ala Glu Gln Lys Ala Leu Ala Thr Lys Leu Lys Leu Pro Pro Thr
 2645 2650 2655
 Phe Phe Cys Tyr Lys Asn Arg Pro Asp Tyr Val Ser Glu Glu Glu Glu
 2660 2665 2670
 Asp Asp Glu Asp Phe Glu Thr Ala Val Lys Lys Leu Asn Gly Lys Leu
 2675 2680 2685
 Tyr Leu Asp Gly Ser Glu Lys Cys Arg Pro Leu Glu Glu Asn Thr Ala
 2690 2695 2700
 Asp Asn Glu Lys Glu Cys Ile Ile Val Trp Glu Lys Lys Pro Thr Val
 2705 2710 2715 2720
 Glu Glu Lys Ala Lys Ala Asp Thr Leu Lys Leu Pro Pro Thr Phe Phe
 2725 2730 2735
 Cys Gly Val Cys Ser Asp Thr Asp Glu Asp Asn Gly Asn Gly Glu Asp
 2740 2745 2750
 Phe Gln Ser Glu Leu Gln Lys Val Gln Glu Ala Gln Lys Ser Gln Thr
 2755 2760 2765
 Glu Glu Ile Thr Ser Thr Thr Asp Ser Val Tyr Thr Gly Gly Thr Glu
 2770 2775 2780
 Val Met Val Pro Ser Phe Cys Lys Ser Glu Glu Pro Asp Ser Ile Thr
 2785 2790 2795 2800
 Lys Ser Ile Ser Ser Pro Ser Val Ser Ser Glu Thr Met Asp Lys Pro
 2805 2810 2815
 Val Asp Leu Ser Thr Arg Lys Glu Ile Asp Thr Asp Ser Thr Ser Gln
 2820 2825 2830
 Gly Glu Ser Lys Ile Val Ser Phe Gly Phe Gly Ser Ser Thr Gly Leu
 2835 2840 2845
 Ser Phe Ala Asp Leu Ala Ser Ser Asn Ser Gly Asp Phe Ala Phe Gly
 2850 2855 2860
 Ser Lys Asp Lys Asn Phe Gln Trp Ala Asn Thr Gly Ala Ala Val Phe
 2865 2870 2875 2880
 Gly Thr Gln Ser Val Gly Thr Gln Ser Ala Gly Lys Val Gly Glu Asp

10

20

30

40

2885 2890 2895
 Glu Asp Gly Ser Asp Glu Glu Val Val His Asn Glu Asp Ile His Phe
 2900 2905 2910
 Glu Pro Ile Val Ser Leu Pro Glu Val Glu Val Lys Ser Gly Glu Glu
 2915 2920 2925
 Asp Glu Glu Ile Leu Phe Lys Glu Arg Ala Lys Leu Tyr Arg Trp Asp
 2930 2935 2940
 Arg Asp Val Ser Gln Trp Lys Glu Arg Gly Val Gly Asp Ile Lys Ile
 2945 2950 2955 2960
 Leu Trp His Thr Met Lys Asn Tyr Tyr Arg Ile Leu Met Arg Arg Asp
 2965 2970 2975
 Gln Val Phe Lys Val Cys Ala Asn His Val Ile Thr Lys Thr Met Glu
 2980 2985 2990
 Leu Lys Pro Leu Asn Val Ser Asn Asn Ala Leu Val Trp Thr Ala Ser
 2995 3000 3005
 Asp Tyr Ala Asp Gly Glu Ala Lys Val Glu Gln Leu Ala Val Arg Phe
 3010 3015 3020
 Lys Thr Lys Glu Val Ala Asp Cys Phe Lys Lys Thr Phe Glu Glu Cys
 3025 3030 3035 3040
 Gln Gln Asn Leu Met Lys Leu Gln Lys Gly His Val Ser Leu Ala Ala
 3045 3050 3055
 Glu Leu Ser Lys Glu Thr Asn Pro Val Val Phe Phe Asp Val Cys Ala
 3060 3065 3070
 Asp Gly Glu Pro Leu Gly Arg Ile Thr Met Glu Leu Phe Ser Asn Ile
 3075 3080 3085
 Val Pro Arg Thr Ala Glu Asn Phe Arg Ala Leu Cys Thr Gly Glu Lys
 3090 3095 3100
 Gly Phe Gly Phe Lys Asn Ser Ile Phe His Arg Val Ile Pro Asp Phe
 3105 3110 3115 3120
 Val Cys Gln Gly Gly Asp Ile Thr Lys His Asp Gly Thr Gly Gly Gln
 3125 3130 3135
 Ser Ile Tyr Gly Asp Lys Phe Glu Asp Glu Asn Phe Asp Val Lys His
 3140 3145 3150
 Thr Gly Pro Gly Leu Leu Ser Met Ala Asn Gln Gly Gln Asn Thr Asn
 3155 3160 3165
 Asn Ser Gln Phe Val Ile Thr Leu Lys Lys Ala Glu His Leu Asp Phe
 3170 3175 3180
 Lys His Val Val Phe Gly Phe Val Lys Asp Gly Met Asp Thr Val Lys
 3185 3190 3195 3200
 Lys Ile Glu Ser Phe Gly Ser Pro Lys Gly Ser Val Cys Arg Arg Ile
 3205 3210 3215
 Thr Ile Thr Glu Cys Gly Gln Ile
 3220

10

20

30

(2) 配列番号35の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 5 アミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数:

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: ペプチド

(xi) 配列: 配列番号35:

Glu Phe Glu Ser Arg
 1 5

40

(2) 配列番号36の情報:

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 5 アミノ酸

50

(B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号36：
Thr Tyr Ser Ala Lys
 1 5

(2) 配列番号37の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：5 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号37：
Leu Asp Asn Ala Arg
 1 5

10

(2) 配列番号38の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：5 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号38：
Thr Tyr Ser Ala Lys
 1 5

20

(2) 配列番号39の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：8 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号39：
Asn Ile Tyr Ser Glu Glu Leu Arg
 1 5

30

(2) 配列番号40の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：7 アミノ酸
 (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号40：
Thr Ala Leu Ser Glu Lys Arg
 1 5

40

(2) 配列番号41の情報：
 (i) 配列の特徴：
 (A) 長さ：11アミノ酸

50

- (B) 型：アミノ酸
 (C) 鎖の数：
 (D) トポロジー：直鎖状
 (ii) 配列の種類：ペプチド
 (xi) 配列：配列番号41：

Leu Ala Leu Asp Met Glu Ile His Ala Tyr Arg
 1 5 10

- (2) 配列番号42の情報：

- (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：8 アミノ酸

10

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号42：

Glu Met Ala Glu Met Arg Ala Arg
 1 5

- (2) 配列番号43の情報：

- (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：15アミノ酸

20

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号43：

Glu Glu Leu Asp Phe Gln Lys Asn Ile Tyr Ser Glu Glu Leu Arg
 1 5 10 15

- (2) 配列番号44の情報：

- (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：15アミノ酸

30

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号44：

Met Gln Gln Gln Leu Asp Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Asp Ile Lys
 1 5 10 15

- (2) 配列番号45の情報：

- (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：15アミノ酸

40

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(xi) 配列：配列番号45：

Glu Glu Leu Asp Phe Gln Lys Asn Ile Tyr Ser Glu Glu Leu Arg
 1 5 10 15

- (2) 配列番号46の情報：

- (i) 配列の特徴：

(A) 長さ：515アミノ酸

50

(B) 型 : アミノ酸

(C) 鎖の数 :

(D) トポロジー : 直鎖状

(ii) 配列の種類 : ペプチド

(xi) 配列 : 配列番号46 :

Thr Ala Leu Ser Glu Lys Arg Thr Leu Glu Gly Glu Leu His Asp Leu
 1 5 10 15
 Arg Gly Gln Val Ala Lys Leu Glu Ala Ala Leu Gly Glu Ala Lys Lys
 20 25 30
 Gln Leu Gln Asp Glu Met Leu Arg Arg Val Asp Ala Glu Asn Arg Leu
 35 40 45
 Gln Thr Met Lys Glu Glu Leu Asp Phe Gln Lys Asn Ile Tyr Ser Glu
 50 55 60
 Glu Leu Arg Glu Thr Lys Arg Arg His Glu Thr Arg Leu Val Glu Ile
 65 70 75 80
 Asp Asn Gly Lys Gln Arg Glu Phe Glu Ser Arg Leu Ala Asp Ala Leu
 85 90 95
 Gln Glu Leu Arg Ala Gln His Glu Asp Gln Val Glu Gln Tyr Lys Lys
 100 105 110
 Glu Leu Glu Lys Thr Tyr Ser Ala Lys Leu Asp Asn Ala Arg Gln Ser
 115 120 125
 Ala Glu Arg Asn Ser Asn Leu Val Gly Ala Ala His Glu Glu Leu Gln
 130 135 140
 Gln Ser Arg Ile Arg Ile Asp Ser Leu Ser Ala Gln Leu Ser Gln Leu
 145 150 155 160
 Gln Lys Gln Leu Ala Ala Lys Glu Ala Lys Leu Arg Asp Leu Glu Asp
 165 170 175
 Ser Leu Ala Arg Glu Arg Asp Thr Ser Arg Arg Leu Leu Ala Glu Lys
 180 185 190
 Glu Arg Glu Met Ala Glu Met Arg Ala Arg Met Gln Gln Gln Leu Asp
 195 200 205
 Glu Tyr Gln Glu Leu Leu Asp Ile Lys Leu Ala Leu Asp Met Glu Ile
 210 215 220
 His Ala Tyr Arg Lys Leu Leu Glu Gly Glu Glu Glu Arg Leu Arg Leu
 225 230 235 240
 Ser Pro Ser Pro Thr Ser Gln Arg Ser Arg Gly Arg Ala Ser Ser His
 245 250 255
 Ser Ser Gln Thr Gln Gly Gly Gly Ser Val Thr Lys Lys Arg Lys Leu
 260 265 270
 Glu Ser Thr Glu Ser Arg Ser Ser Phe Ser Gln His Ala Arg Thr Ser
 275 280 285

10

20

30

Gly Arg Val Ala Val Glu Glu Val Asp Glu Glu Gly Lys Phe Val Arg
 290 295 300
 Leu Arg Asn Lys Ser Asn Glu Asp Gln Ser Met Gly Asn Trp Gln Ile
 305 310 315 320
 Lys Arg Gln Asn Gly Asp Asp Pro Leu Leu Thr Tyr Arg Phe Pro Pro
 325 330 335
 Lys Phe Thr Leu Lys Ala Gly Gln Val Val Thr Ile Trp Ala Ala Gly
 340 345 350
 Ala Gly Ala Thr His Ser Pro Pro Thr Asp Leu Val Trp Lys Ala Gln
 355 360 365
 Asn Thr Trp Gly Cys Gly Asn Ser Leu Arg Thr Ala Leu Ile Asn Ser
 370 375 380
 Thr Gly Glu Glu Val Ala Met Arg Lys Leu Val Arg Ser Val Thr Val
 385 390 395 400
 Val Glu Asp Asp Glu Asp Glu Asp Gly Asp Asp Leu Leu His His His
 405 410 415
 His Gly Ser His Cys Ser Ser Ser Gly Asp Pro Ala Glu Tyr Asn Leu
 420 425 430
 Arg Ser Arg Thr Val Leu Cys Gly Thr Cys Gly Gln Pro Ala Asp Lys
 435 440 445
 Ala Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ala Gln Val Gly Gly Pro Ile Ser Ser
 450 455 460
 Gly Ser Ser Ala Ser Ser Val Thr Val Thr Arg Ser Tyr Arg Ser Val
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Phe Gly Asp Asn Leu Val Thr Arg Ser
 485 490 495
 Tyr Leu Leu Gly Asn Ser Ser Pro Arg Thr Gln Ser Pro Gln Asn Cys
 500 505 510
 Ser Ile Met
 515

10

20

【図 1 A】

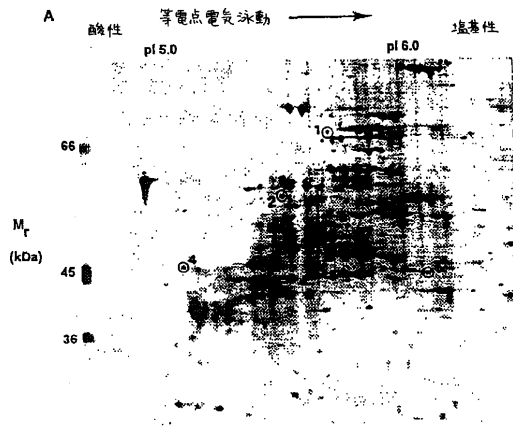


Fig. 1A

【図 1 B】

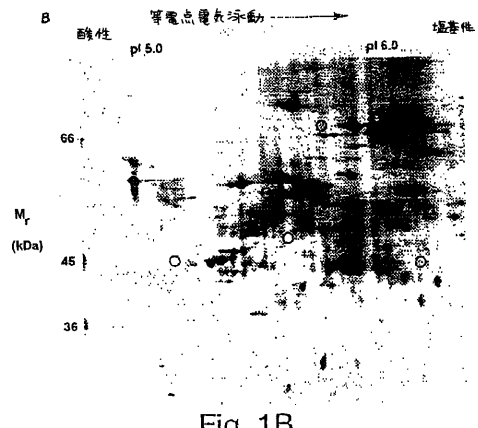


Fig. 1B

【図 2 A】

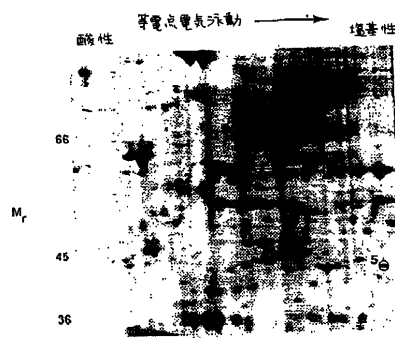


Fig. 2A

【図 2 B】

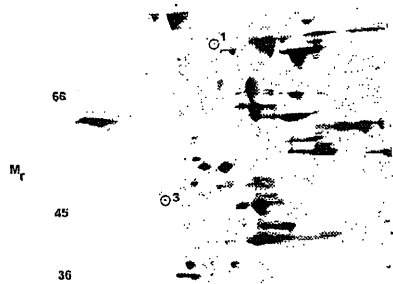


Fig. 2B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
C 0 7 K	16/32	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 0 7 K	16/32	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/577	(2006.01)	C 1 2 Q	1/68	A
			G 0 1 N	33/577	B

(72)発明者 ウー, イン ジェ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 0 1, フラミンガム, フラナガン ドライブ 7 1

審査官 竹中 靖典

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

G01N 33/574

A61K 31/7088

A61K 39/395

A61K 45/00

A61K 48/00

A61P 15/00

A61P 35/00

C07K 16/32

C12N 15/09

C12P 21/08

C12Q 1/68

G01N 33/577